



Università degli Studi di Cagliari

**DOTTORATO DI RICERCA
IN NEUROSCIENZE**

Ciclo XXIII

**SVILUPPO DI UNA PIATTAFORMA DI INDAGINE GENETICA
APPLICATA ALLA SCELTA DELLA TERAPIA PSICOFARMACOLOGICA
E STUDIO DELLE VARIANTI ALLELICHE DEL CITOCROMO P450
NELLA POPOLAZIONE SARDA**

Settore scientifico disciplinare di afferenza:

Scienze Biologiche

Presentata da: Matteo Falzoi

Coordinatore Dottorato: Prof. Alessandra Concas

Relatore: Prof. Walter Fratta

Esame finale anno accademico 2009 - 2010

Ogni farmaco attivo può diventare un veleno quando viene assunto ad altissime dosi; una stessa dose di farmaco, innocua nella maggior parte delle persone, può essere tossica per altre; altre persone infine, mostrano un eccezionale livello di tollerabilità per quello stesso farmaco.

Archibald Garrod, “*Inborn Errors of metabolism*”, 1909

INDICE

1. INTRODUZIONE	4
1.1 Farmacogenetica degli antipsicotici	4
1.2 Il Citocromo P450	5
1.2.1 CYP3A4	12
1.2.2 CYP3A5	14
1.2.3 CYP2C9	15
1.2.4 CYP2C19	16
1.2.5 CYP2D6	18
1.3 SNPs e Farmacogenetica	20
1.4 Tecnologia MALDI-TOF MS	21
2. OBIETTIVI	25
3. MATERIALI & METODI	26
3.1 Popolazione studiata	26
3.2 Estrazione del DNA e quantificazione	26
3.3 Selezione SNPs e sequenze	27
3.4 Analisi MALDI-TOF MS	28
3.4.1 Piattaforma Multigenica	40
3.4.2 Piattaforma Monogenica	42
3.4.3 Purificazione	44
3.4.4 Misurazione MALDI-TOF MS	44
3.5 Allelic Discrimination	48
3.6 Analisi PCR-RFLP	51
3.7 Copy Number Variation	52

3.8 Determinazione degli aplotipi	54
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	56
4.1 Piattaforma multigenica	56
4.2 Piattaforma monogenica	62
5. CONCLUSIONI	67
6. BIBLIOGRAFIA	71

1. INTRODUZIONE

1.1 Farmacogenetica degli antipsicotici

La variabilità individuale nella risposta alle terapie con antipsicotici rappresenta un problematica psicofarmacologica di grande rilevanza. Circa il 30-40% degli individui affetti da patologie psichiatriche non risponde al trattamento farmacologico o ha una risposta parziale. Inoltre un'elevata percentuale dei pazienti che risponde ai trattamenti, presenta effetti collaterali (1-3).

Nella pratica clinica, antipsicotici atipici quali ad esempio Amisulpride, Aripirazolo, Clozapina, Olanzapina, Paliperidone, Quetiapina, Risperidone e Ziprasidone, sono largamente utilizzati nel trattamento delle patologie psichiatriche e nelle terapie di mantenimento a lungo termine. Questi composti sono generalmente ritenuti ugualmente efficaci e meglio tollerati degli antipsicotici tradizionali, per la minore frequenza di sintomi extrapiramidali (distonia, parkinsonismo, acatisia e discinesia tardiva). Ma la comparsa di effetti collaterali, quali sedazione, ipotensione posturale e aumento di peso, è descritta anche per questa tipologia farmaci (4).

Attualmente la scelta del farmaco viene effettuata per tentativi ed errori; la terapia viene spesso modificata fino quando non si individuano la combinazione ed il dosaggio dei farmaci adatti per ciascun paziente. Questo approccio può, appunto, portare spesso ad esporre il paziente agli effetti non desiderati prima descritti, rappresentando inoltre un costo gravoso per il Servizio Sanitario Nazionale, mentre la personalizzazione della terapia farmacologica sulla base del profilo genetico del paziente viene applicata solo nei casi in cui siano noti gli effetti diretti prodotti da singole mutazioni geniche (5). Ne sono esempi la bradicardia indotta dal Metoprololo in assenza dell'enzima CYP2D6 o le emorragie indotte dalla Warfarina in caso di deficit funzionale del gene *CYP2C9*. In ogni caso, l'ottimizzazione delle strategie terapeutiche su base genetica è ancora lontana per la cura di comuni patologie

multifattoriali, sia psichiatriche, ma anche cardiovascolari e di alcune forme di cancro, nelle quali i medici osservano con maggiore frequenza la variabilità nella risposta alle terapie.

Negli ultimi anni è aumentata la consapevolezza che per trovare le cause che determinano la resistenza ai farmaci, la comparsa di effetti avversi o, in generale, la risposta individuale e variabile alle terapie, è necessario reindirizzare le attività di ricerca dallo studio dei singoli geni allo studio del genoma umano nella sua totalità.

Lo sviluppo di test di screening che possano predire il rischio individuale di sviluppare reazioni avverse come i sintomi extrapiramidali o la discinesia tardiva per gli antipsicotici tipici o come l'aumento di peso e le reazioni metaboliche avverse per i farmaci atipici, potrebbe indirizzare la scelta del medico verso i farmaci, tipici o atipici, che più si adattano al profilo di rischio del paziente.

Per questo motivo, razionalizzare la scelta della terapia farmacologica sulla base della costituzione genetica dell'individuo è un'esigenza impellente in quest'area terapeutica (6).

1.2 Il Citocromo P450

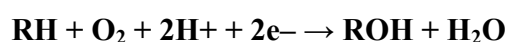
Gli antipsicotici sono composti liposolubili che, per essere escreti dall'organismo, devono essere trasformati in sostanze idrosolubili. Le reazioni responsabili di tali trasformazioni vengono classificate in reazioni di fase 1 (ossidazione, riduzione e idrolisi) e reazioni di fase 2 (coniugazione con acido glucuronico, acetico, solforico, etc.).

La maggior parte delle interazioni farmacocinetiche per gli antipsicotici vengono mediate dagli enzimi di fase 1 ed in particolare del Citocromo P450 (CYP450).

Il Citocromo P450 deriva il suo nome dal caratteristico picco di Soret di assorbimento massimo ad una lunghezza d'onda di 450 nm, quando il ferro del gruppo eme si trova nello stato ridotto Fe^{2+} e legato al monossido di carbonio (7).

Sono note più di 7700 distinte macromolecole di tipo CYP450 (8) appartenenti alla sottoclasse enzimatica delle ossidasi a funzione mista, o monoossigenasi (9). Gli isoenzimi del CYP450 sono i maggiori fattori coinvolti nei processi di ossidazione e nella detossificazione dell'organismo, essendo in grado di agire su una gran numero di differenti substrati, sia esogeni, come farmaci, tossine e inquinanti di origine esterna, che endogeni (10), come, per esempio, la bilirubina derivante dal metabolismo dell'emoglobina o su altri prodotti di scarto dell'organismo. Gli isoenzimi CYP450 agiscono anche sulla regolazione dei livelli di concentrazione degli ormoni steroidei, come gli estrogeni ed il testosterone, sulla biosintesi del colesterolo e sul metabolismo della vitamina D; a livello della barriera ematoencefalica, agiscono sull'autoregolazione vascolare (11) e, spesso, prendono parte a complessi con funzione di catena di trasporto di elettroni, noti come sistemi contenenti P450.

Le reazioni catalizzate dalle isoforme del CYP450 sono svariate. La più comune è una classica reazione da monoossigenasi: il trasferimento di un atomo di ossigeno dall'ossigeno molecolare ad un substrato organico, con riduzione del secondo atomo di ossigeno ad acqua:



dove RH è il substrato e ROH è il prodotto di monoossigenazione.

Esempi di reazioni catalizzate dal citocromo P450 sono l'ossidrilazione di composti alifatici o aromatici, la formazione di epossidi e l'ossidazione di alcoli.

Il centro catalitico di reazione del CYP450 è il centro eme-tiolato, altamente conservato in tutte le isoforme conosciute, contenente un gruppo eme in cui un atomo di ferro è legato non covalentemente allo zolfo di un residuo cisteinico. Il meccanismo di azione del citocromo è differente a seconda del tipo di reazione catalizzata, e può essere riassunto in sei fasi (Figura 1):

- legame del substrato al citocromo P450;
- riduzione dell'atomo di ferro del gruppo eme;
- legame dell'ossigeno molecolare al citocromo;
- trasferimento di un secondo elettrone;
- formazione di una molecola d'acqua;
- catalisi della specifica reazione.

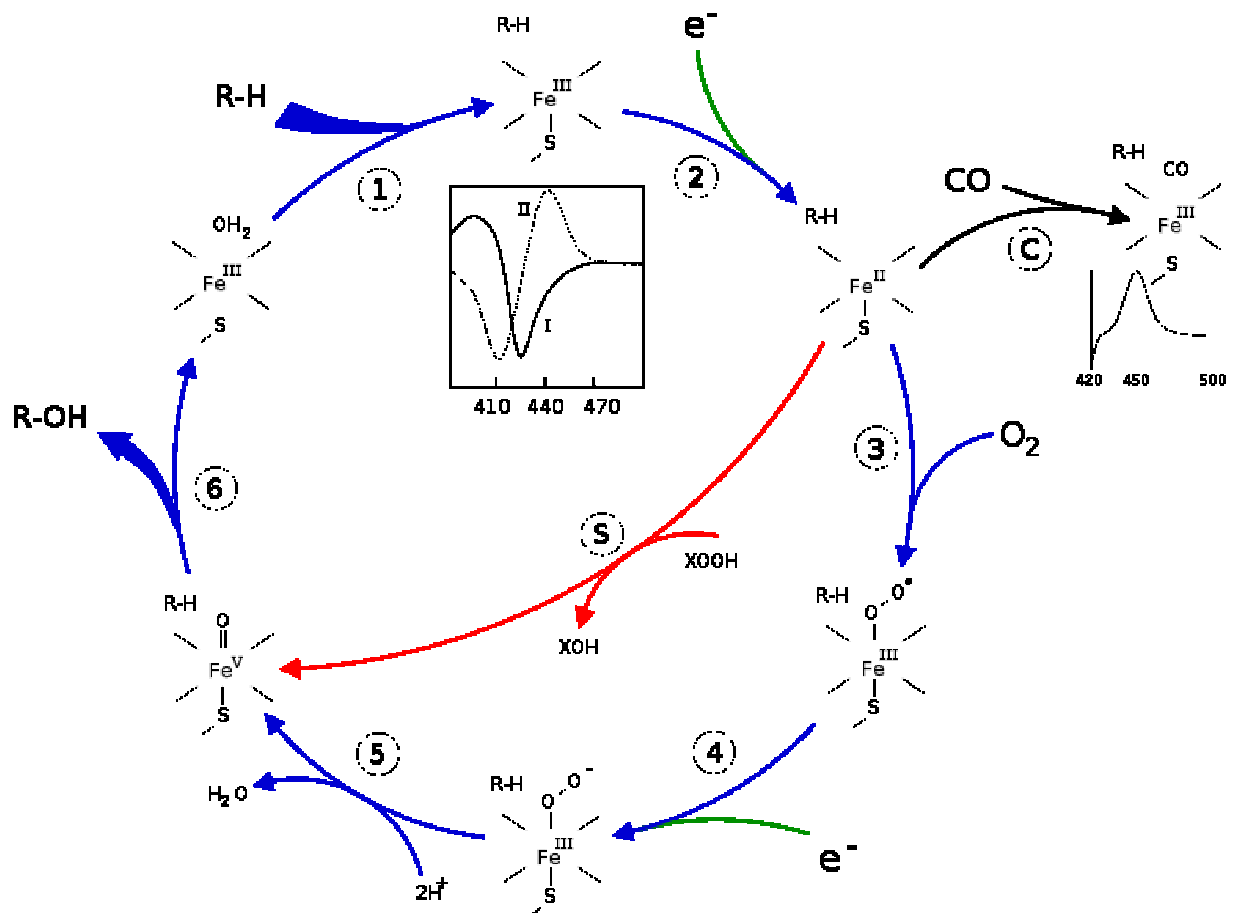


Figura 1. Esempio di meccanismo di azione del CYP450: Il substrato si lega al sito attivo dell'enzima, nelle vicinanze del gruppo eme, sul lato opposto della catena peptidica. Il substrato legato induce un cambiamento nella conformazione del sito attivo, spesso eliminando una molecola d'acqua (12), e talvolta cambiando lo stato del ferro eme da fondamentale ad eccitato (13). Questo causa un cambiamento nelle proprietà spettrali dell'enzima, con un aumento dell'assorbanza a 390nm e una diminuzione a 420nm. Q questo complesso può rimanere stabile, permettendo di stabilire il grado di legame da misure di assorbanza *in vitro* (14). Fe = atomo di ferro dell'eme. RH=substrato; ROH=prodotto di monossigenazione.

I singoli enzimi componenti la famiglia dei citocromi P450 sono identificati attraverso la sigla comune "CYP" seguita da un numero arabo indicante la famiglia (>40% di omologia di sequenza), una lettera in maiuscolo che definisce la sottofamiglia (>55% di omologia di sequenza) ed un secondo numero arabo che specifica il singolo gene (es. *CYP3A4*) (15). Convenzionalmente, i geni corrispondenti agli enzimi sono indicati con il medesimo nome, ma con caratteri scritti in corsivo; ad esempio il gene *CYP2D6* codifica per l'enzima CYP2D6.

Nell'uomo sono state sinora identificati 57 geni codificanti per isoforme del CYP450 e più di 59 pseudogeni, suddivisi in 18 famiglie e 43 sottofamiglie (Tabella 1) (8,15,16). Gli enzimi espressi dai geni della famiglia del CYP450, sono localizzati sulle membrane del reticolo endoplasmatico liscio e presenti in quasi tutte le cellule eucariotiche, in modo particolare nel fegato ed in altri tessuti come il tratto gastrointestinale, i reni, i polmoni, la cute ed il sistema nervoso centrale (11). Nella grande maggioranza dei casi una singola isoforma di citocromo P450 può presentare specificità multiple e catalizzare l'ossidazione di più substrati diversi, anche con differenti tipi di reazioni.

I 57 geni CYP450 attualmente noti sono presenti nella popolazione in varianti alleliche associate a livelli ridotti o elevati di attività enzimatica, ed i loro prodotti proteici rappresentano il principale meccanismo di detossificazione dell'organismo per i farmaci, divenendo quindi una delle cause alla base della variabilità del rapporto dose/risposta in soggetti differenti che assumono lo stesso farmaco (17). Il differente range di risposta può infatti derivare, oltre che da fattori fisiologici come l'età, il sesso e lo stato di salute dell'individuo, anche da una differente velocità di metabolizzazione del principio attivo, derivante a sua volta dalla presenza di polimorfismi genetici a singolo nucleotide (Single Nucleotide Polymorphisms o SNPs) nella famiglia di geni del CYP450, o di altri riarrangiamenti genici, quali inserzioni e/o delezioni nucleotidiche o, ancora, di variazioni nel numero di copie di geni.

Famiglia	Funzione	Membri	Nomi
CYP1	metabolismo farmaci e steroidi (specialmente estrogeno)	3 sottofamiglie, 3 geni, 1 pseudogene	<i>CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1</i>
CYP2	metabolismo farmaci e steroidi	13 sottofamiglie, 16 geni, 16 pseudogeni	<i>CYP2A6, CYP2A7, CYP2A13, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2F1, CYP2J2, CYP2R1, CYP2S1, CYP2U1, CYP2W1</i>
CYP3	metabolismo farmaci e steroidi	1 sottofamiglia, 4 geni, 2 pseudogeni	<i>CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43</i>
CYP4	metabolismo acido arachidonico e altri acidi grassi	6 sottofamiglie, 12 geni, 10 pseudogeni	<i>CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4V2, CYP4X1, CYP4Z1</i>
CYP5	thromboxane A ₂ synthase	1 sottofamiglia, 1 gene	<i>CYP5A1</i>
CYP7	biosintesi acido biliare 7-alpha hydroxylase	2 sottofamiglie, 2 geni	<i>CYP7A1, CYP7B1</i>
CYP8	prostacyclin synthase; biosintesi acidi biliari	2 sottofamiglie, 2 geni	<i>CYP8A1, CYP8B1</i>
CYP11	biosintesi steroidi	2 sottofamiglie, 3 geni	<i>CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2</i>
CYP17	biosintesi steroidi e 17-alpha hydroxylase	1 sottofamiglia, 1 gene	<i>CYP17A1</i>
CYP19	biosintesi steroide aromatase synthesizes estrogen	1 sottofamiglia, 1 gene	<i>CYP19A1</i>
CYP20	funzione sconosciuta	1 sottofamiglia, 1 gene	<i>CYP20A1</i>
CYP21	biosintesi steroidi	2 sottofamiglie, 1 gene, 1 pseudogene	<i>CYP21A2</i>
CYP24	degradazione vitamina D	1 sottofamiglia, 1 gene	<i>CYP24A1</i>
CYP26	retinoic acid hydroxylase	3 sottofamiglie, 3 geni	<i>CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1</i>
CYP27	biosintesi acidi biliari; vitamin D ₃ 1-alpha hydroxylase; attivazione vitamine D ₃	3 sottofamiglie, 3 geni	<i>CYP27A1, CYP27B1, CYP27C1</i>
CYP39	7-alpha hydroxylation del 24-hydroxycholesterol	1 sottofamiglia, 1 gene	<i>CYP39A1</i>
CYP46	cholesterol 24-hydroxylase	1 sottofamiglia, 1 gene	<i>CYP46A1</i>
CYP51	biosintesi colesterolo; lanosterol 14-alpha demethylase	1 sottofamiglia, 1 gene 3 pseudogeni	<i>CYP51A1</i>

Tabella 1. Famiglie del CYP450 umani. Negli umani, la famiglia del CYP450 comprende 57 geni e più di 59 pseudogeni, suddivisi in 18 famiglie e 43 sottofamiglie (8,15,16).

Durante l'evoluzione, i geni codificanti gli enzimi CYP450 hanno accumulato diverse mutazioni causando così una variabilità nel fenotipo, che va dalla perdita totale di attività dell'enzima a varianti in cui l'attività è invece accresciuta. La variabilità genetica nei geni codificanti i CYP450 è perciò determinante nella differente suscettibilità individuale all'azione dei farmaci e altre sostanze chimiche ambientali (18).

Un più lento smaltimento della molecola farmacologicamente attiva può portare ad una sua eccessiva permanenza nell'organismo, e quindi al manifestarsi di effetti collaterali dovuti al sovradosaggio, mentre un'eccessiva attività del citocromo aumenta la velocità di smaltimento del farmaco e può portare ad una diminuzione del suo effetto o anche alla mancanza di effetti clinici.

La presenza di riarrangiamenti genici può determinare una variabilità interindividuale che giustifica la presenza nella popolazione generale di diversi sottogruppi o fenotipi con differente attività metabolica, che vengono classificati come (19):

- metabolizzatori lenti o poor metabolizer (PM): non producono concentrazioni sufficienti di enzimi funzionalmente attivi, eliminano molto più lentamente i vari farmaci metabolizzati da quello stesso enzima e sono quindi esposti al rischio di raggiungere elevate concentrazioni plasmatiche del farmaco e di sviluppare effetti collaterali concentrazione-dipendenti.
- metabolizzatori estesi o extensive metabolizer (EM): dotati di un normale metabolismo farmacologico. Di solito presentano due alleli attivi del gene oppure un allele funzionale ed uno parzialmente attivo.
- metabolizzatori intermedi o intermediate metabolizer (IM): portatori in eterozigosi di una mutazione, presentano cioè un allele normale ed uno non funzionale o due alleli parzialmente funzionali; per conseguire un'azione terapeutica ottimale, essi possono richiedere un dosaggio farmacologico inferiore alla norma.

- metabolizzatori ultrarapidi o ultra-rapid metabolizer (UM): hanno un'aumentata espressione genica dovuta alla presenza di tre o più alleli funzionali, a causa di una duplicazione o multi-duplicazione di un allele funzionale (ad es. duplicazioni del gene *CYP2D6*). Per un'azione terapeutica ottimale, i metabolizzatori rapidi possono richiedere un dosaggio farmacologico superiore alla norma.

I metabolizzatori UM e PM sono quelli a maggior rischio, rispettivamente, di fallimento nel trattamento e tossicità dose-dipendente (20).

Inoltre, il metabolismo ossidativo mediato dai citocromi può però essere influenzato anche da fattori non genetici, quali la concomitante somministrazione di altri farmaci, pratica frequente in psicofarmacologia, che può generare fenomeni di inibizione o di induzione enzimatica (21).

Infatti, molti farmaci possono avere un effetto induttivo o inibitore dell'attività di una o più isoforme del CYP450, e questi fenomeni sono alla base, nella maggior parte dei casi, degli effetti compromettenti sull'azione terapeutica e degli effetti di tossicità derivanti dall'assunzione contemporanea di differenti principi attivi. Un effetto di inibizione dovuto ad interazioni fra due farmaci si manifesta quando entrambi sono substrati di una stessa isoforma di citocromo P450; in questo caso, il farmaco che presenta una minore affinità di legame sarà smaltito in un tempo superiore rispetto al caso in cui sia assunto singolarmente, provocando un effetto di sovradosaggio e quindi il manifestarsi di effetti collaterali tossici. Allo stesso modo, un farmaco può essere in grado di indurre, nel tempo, un aumento nella concentrazione e nell'attività di una o più isoforme di citocromo P450, diminuendo quindi il tempo di permanenza nell'organismo dei farmaci che ne sono substrati, e di conseguenza la loro azione terapeutica. L'effetto induttivo si manifesta più lentamente rispetto all'inibizione, in quanto agisce a livello di trascrizione genica e necessita quindi di maggior tempo per evidenziarsi (22).

L'effetto degli inibitori del CYP450 è meno evidente nei PM, ovvero in coloro che sono già carenti dell'enzima funzionale. Gli UM sono invece più sensibili a interazioni di tipo inibitorio e possono

diventare fenotipicamente indistinguibili dai PM. Gli EM, infine, possono acquisire un fenotipo PM o UM per effetto, rispettivamente dell'inibizione e dell'induzione enzimatica.

Partendo dalla conoscenza del meccanismo d'azione degli antipsicotici, sono stati selezionati i geni che, in base alla loro funzione fisiologica e biochimica, possono influenzare direttamente o indirettamente la risposta a questi farmaci. Degli isoenzimi CYP450 conosciuti, cinque in particolare svolgono un ruolo importante nel metabolismo degli antipsicotici e precisamente: CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9, CYP2C19 e CYP2D6 (23).

1.2.1 CYP3A4

Il gene *CYP3A4* fa parte del cluster genico CYP3A, è situato sul cromosoma 7, locus q21.1 (24,25). Il CYP3A4 (Figura 2) è l'isoenzima CYP450 più diffuso nel fegato e nel piccolo intestino dell'adulto, è uno fra i più importanti enzimi coinvolti nel metabolismo dei xenobiotici, è coinvolto nella maggior parte dei processi di ossidazione (26,27) di circa la metà dei farmaci utilizzati oggi, tra i quali si possono ricordare: Paracetamolo, Codeina, Ciclosporina A, Diazepam, Eritromicina e alcuni carcinogeni (Tabella 2). È inoltre coinvolto nei processi di sintesi di colesterolo, steroidi ed altri lipidi. L'enzima è anche presente a livello intestinale e, recentemente, è stata identificata la sua presenza nel cervello, anche se il suo ruolo nel sistema nervoso centrale resta ancora sconosciuto (28). Attualmente oltre 30 SNPs sono stati identificati in questo gene e sono state descritte 20 varianti alleliche (8).

Substrati	Inibitori	Induttori
immunosoppressanti chemoterapici antimicotici (31) antibiotici (31) antidepressivi triciclici SSRI buspirone (ansiolitico) venlafaxina (SNRI) antipsicotici (32): - aripiprazolo - aloperidolo - risperidone - ziprasidone - clozapina - quetiapina analgesici oppiacei: - alfentanil - codeina - fentanyl - metadone benzodiazepine: - alprazolam - clonazepam - flunitrazepam - midazolam - triazolam - pimozone statine calcio-antagonisti amiodarone (antiaritmico) PDE5 inhibitors chinine agonisti e antagonisti degli ormoni sessuali astemizolo (antistaminico e antipruriginoso) (34) warfarina (anticoagulante)	inibitori proteasi antibiotici (31), quali cloramfenicolo (33) antimicotici (31) bergamottina (costituente del succo di pompelmo) quercetina (integratore alimentare) aprepitant (antiemetico) verapamil (calcio-antagonista) antidepressivi: - fluoxetina (32) - fluvoxamina (32) - nefazodone olanzapina (antipsicotico) (32) nicotina (32)	anticonvulsanti, stabilizzatori dell'umore: - fenitoina (32) - carbamazepina (31) - oxcarbazepina iperforina (32) barbiturici (31), quali fenobarbital NNRTIs rifampicina (31) (battericida) modafinil (psicostimolante) ciproterone (antiandrogeno)

Tabella 2: Maggiori induttori, inibitori e substrati dell'isoenzima CYP3A4 (29,30) (SSRI=selective serotonin reuptake inhibitors; SNRI=serotonin–norepinephrine reuptake inhibitors; PDE5=phosphodiesterase type 5; NNRTI=non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors).

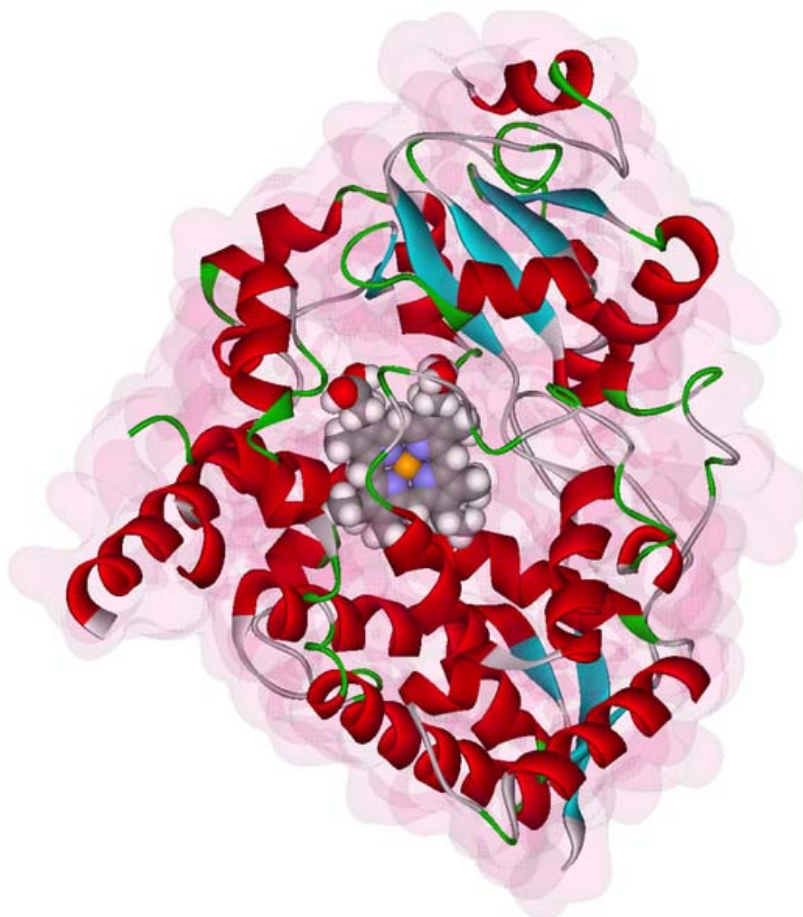


Figura 2. Rappresentazione grafica del CYP3A4, l'isoenzima maggiormente coinvolto nel metabolismo dei farmaci. Il gruppo eme è visibile al centro.

1.2.2 CYP3A5

L'enzima CYP3A5, espresso principalmente a livello epatico, presenta varianti polimorfe nell'adulto nel 10-20% dei Caucasici (35). È coinvolto nel metabolismo di farmaci quali Nifedipina ed alcune ciclosporine, e nel metabolismo di alcuni ormoni steroidei quali testosterone, progesterone e androstenedione. Insieme all'isoenzima CYP3A4, è inoltre responsabile del metabolismo di numerosi antidepressivi, agenti immunosoppressivi, antibiotici e inibitori delle proteasi (35).

Il gene *CYP3A5* è localizzato sul cromosoma 7, locus q21.1. Il cluster genico CYP3A include lo pseudogene *CYP3A5P1*. La similarità fra gene e pseudogene ha causato non poche difficoltà nel sequenziamento del gene (36). Attualmente oltre 20 SNPs sono stati identificati in questo gene e sono state descritte 11 varianti alleliche (8).

1.2.3 CYP2C9

L'isoenzima CYP2C9 (Figura 3) codificato dal gene *CYP2C9*, ha un ruolo fondamentale nei meccanismi di ossidazione di xenobiotici e composti endogeni (37,38). È coinvolto nel metabolismo di circa il 16% dei farmaci di uso comune attualmente in commercio, come Acenocumarolo, Tolbutamide, Losartan, Glipizide, e alcuni Farmaci Antinfiammatori Non Steroidei (FANS). Il CYP2C9 interviene anche nel metabolismo di altri farmaci di uso meno comune, quali gli anticoagulanti Warfarina e Sintrom, e l'antiepilettico Fenitoina (Tabella 3). Interviene inoltre nel metabolismo dell'acido arachidonico e linoleico (39). Il gene *CYP2C9* è localizzato sul cromosoma 10, locus q24.1 (40) ed è altamente polimorfo. Attualmente sono state descritte 34 varianti alleliche e più di 30 SNPs sono stati identificati nelle regioni regolatorie e codificanti di questo gene (8,41), alcune delle quali sono associate ad una significativa riduzione dell'attività enzimatica. Specialmente per substrati quali Warfarina e Fenitoina, la presenza di SNPs e la ridotta attività dell'enzima, possono causare fenomeni di tossicità a dosi normalmente terapeutiche (42,43).

Substrati	Inibitori	Induttori
FANS: - celecoxib - lornoxicam (44) - diclofenac - ibuprofene - naproxene - piroxicam - meloxicam fenitoina (32) (antiepilettico) fluvastatina sulfoniluree (antidiabetici) antagonista del recettore per l'angiotensina II warfarina (anticoagulante) diazepam (32)	benzbromarone (uricosurico) amentoflavone (45,46) sulfaphenazole (antibiotico) fluconazolo (antimicotico) acido valproico (32) (anticonvulsivante, stabilizzante dell'umore) antidepressivi (32): - fluoxetina - fluvoxamina	rifampicina (battericida) antiepilettici (32): - carbamazepina - fenitoina

Tabella 3. Maggiori induttori, inibitori e substrati dell'isoenzima CYP2C9 (29,30) (FANS=Farmaci antinfiammatori non steroidei).

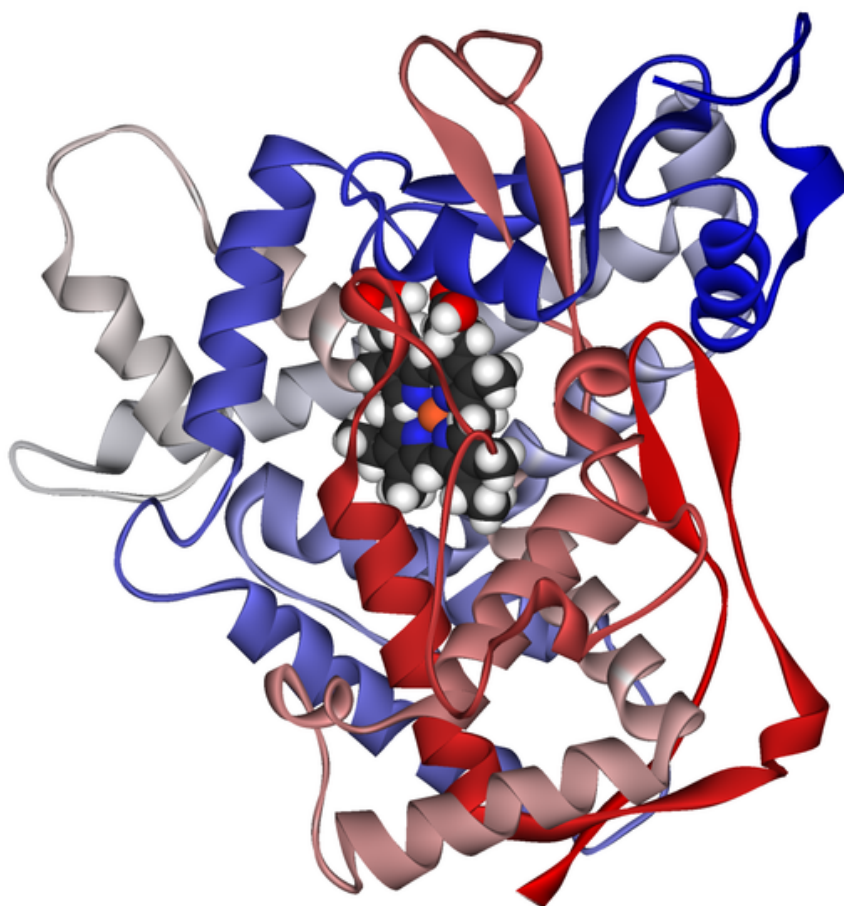


Figura 3. Rappresentazione grafica dell'isoenzima CYP2C9, coinvolto nel metabolismo di circa il 16% dei farmaci. Il gruppo eme è visibile al centro.

1.2.4 CYP2C19

L'isoenzima CYP2C19 (Figura 4) codificato dal gene *CYP2C19* (37,47) ha un ruolo fondamentale nei meccanismi di ossidazione di composti xenobiotici. È coinvolto nel metabolismo di circa il 5-10% dei farmaci ad oggi in commercio (Tabella 4), inclusi inibitori della pompa protonica (Omeprazolo), antiepilettici (Fenitoina), anticonvulsivanti (Mefenitoina, Diazepam), alcuni barbiturici, benzodiazepine, antidepressivi triciclici e alcuni farmaci anti-tumorali. Il gene *CYP2C19* è localizzato sul cromosoma 10, locus q24 (48). I polimorfismi genetici più importanti sono presenti approssimativamente nel 3–5% della popolazione Caucasiaca, dando luogo, in modo particolare, alla presenza di fenotipi PM (49,50). Attualmente oltre 30 SNPs sono stati identificati in questo gene e sono state descritte 28 varianti alleliche (8).

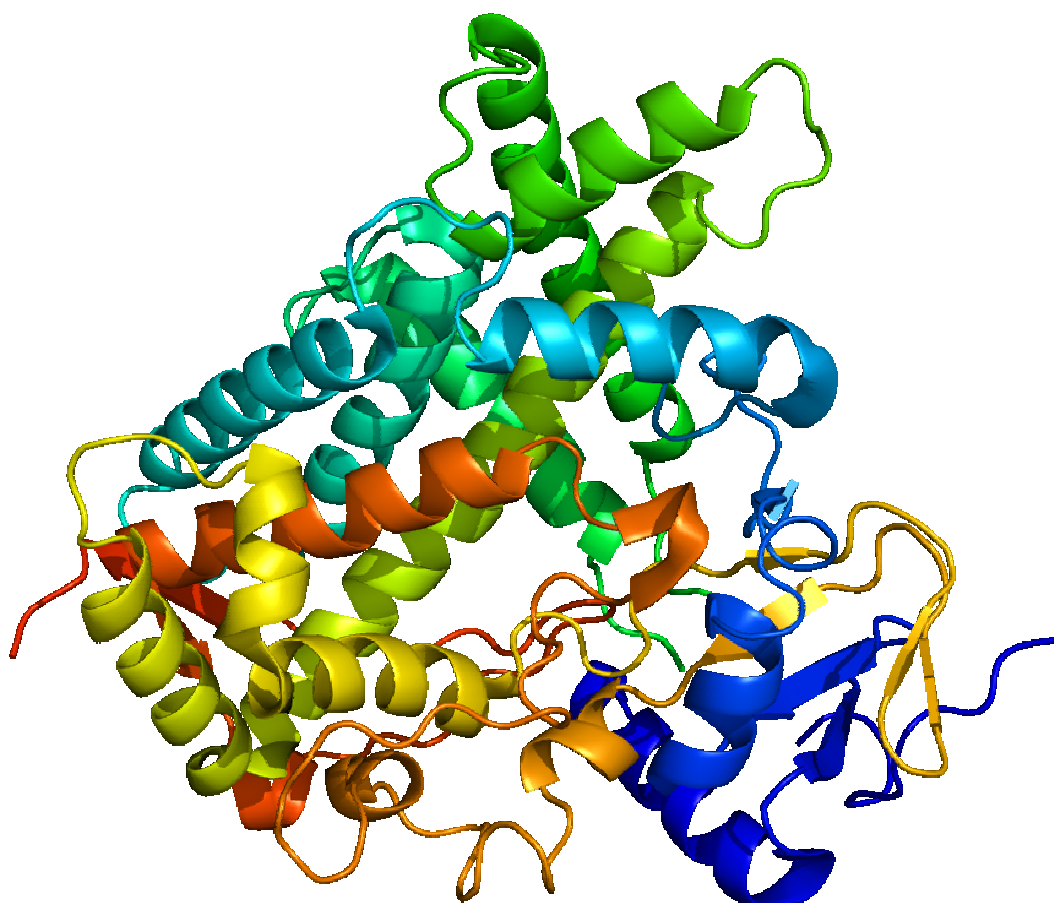


Figura 4. Rappresentazione grafica dell'isoenzima CYP2C19, coinvolto nel metabolismo di circa il 5-10% dei farmaci.

Substrati	Inibitori	Induttori
antidepressivi: - triciclici: ○ amitriptilina ○ clomipramina ○ imipramina - citalopram (SSRI) - moclobemide antiepileptici: - nordazepam - diazepam - fenitoina - fenobarbital - primidone inibitori della pompa protonica proguanil (profilassi antimalarica)	moclobemide (antidepressivo) fluvoxamina (SSRI) cloramfenicolo (antimicrobico) (33)	rifampicina (battericida) carbamazepina (anticonvulsante, stabilizzatore dell'umore)

Tabella 4. Maggiori induttori, inibitori e substrati dell'isoenzima CYP2C19 (29,30).

1.2.5 CYP2D6

Fra gli isoenzimi del Citocromo P450 uno dei più importanti è il CYP2D6 (Figura 5). Nonostante sia quantitativamente uno dei meno rappresentati, catalizza il metabolismo di più del 25% dei farmaci usati nella clinica (Tabella 5). Tra questi vi sono numerosi farmaci cardiovascolari, fra cui antiaritmici (Propafenone, Encainide, Flecainide) e beta-bloccanti (Timololo, Metoprololo, Propranololo), derivati della morfina e numerosi psicofarmaci, fra cui antidepressivi (Nortriptilina, Desipramina, Fluoxetina) ed antipsicotici (Perfenazina, Tioridazina, Aloperidolo, Risperidone). Variazioni genetiche nei livelli d'espressione o funzione dell'isoenzima CYP2D6 causano effetti profondi sulla efficacia e sulla tossicità di questi farmaci.

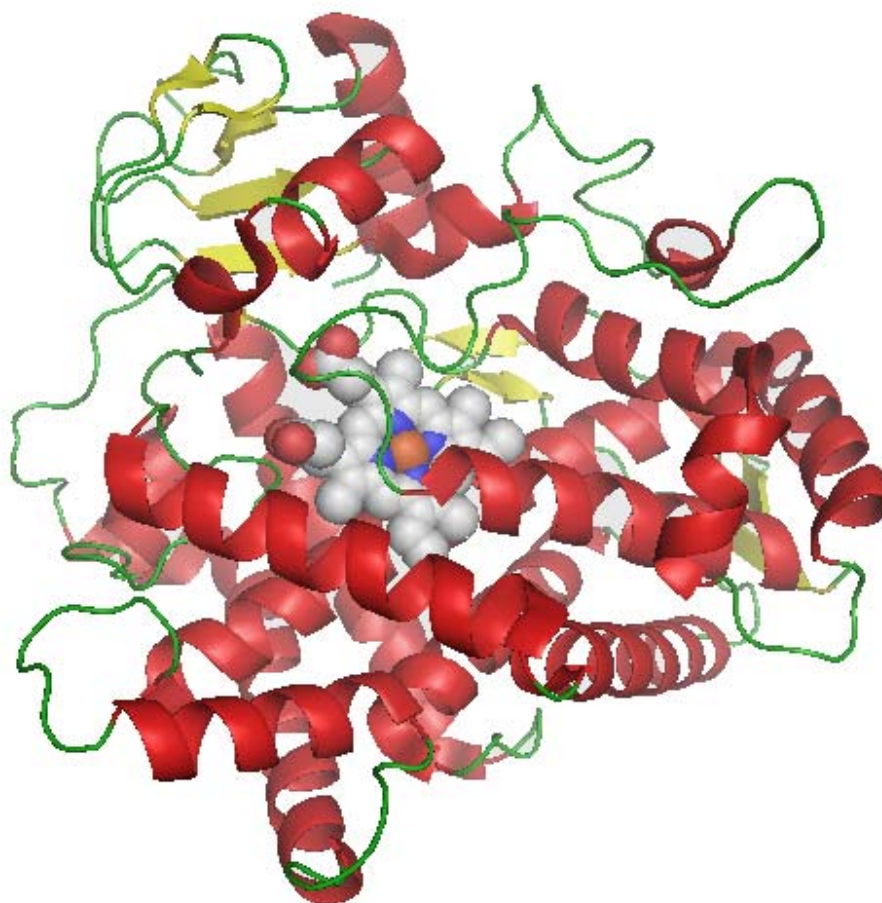


Figura 5. Rappresentazione grafica dell'isoenzima CYP2D6, coinvolto nel metabolismo di più del 25% dei farmaci usati nella clinica. Il gruppo eme è visibile al centro.

Substrati	Inibitori	Induttori
beta-bloccanti debrisoquina (anti-ipertensivo) antiaritmici di classe I: - flecainide - lidocaina - propafenone - encainide - mexiletina tutti gli antidepressivi triciclici: - imipramina - amitriptilina - etc. altri antidepressivi: - fluoxetina - paroxetina - venlafaxina - etc. oppioidi: - codeina - tramadolo antipsicotici: - aloperidolo (32) - risperidone (32) - perfenazina (32) - tioridazina (32) - zuclopentixolo (32) - remoxipride - aripiprazolo - aripiprazolo (32) - clorpromazina (32) - clozapina (32) - olanzapina (32) ondansetron (antiemetico) destrometorfano (antitussivo) mianserina (antidepressivo tetraciclico) amfetamina	SSRIs: - citalopram - fluoxetina - paroxetina antidepressivi triciclici: - clomipramina - doxepina - imipramina altri antidepressivi: - bupropione (32) - duloxetina - moclobemide (32) - fluoxetina (32) - paroxetina (32) - fluvoxamina (32) terbinafina (antimicotico) chinidina (antiaritmico di classe I) MDMA (ecstasy) antipsicotici: - clorpromazina (32) - aloperidolo (32) - levomepromazine - pimozide - tioridazina cocaina metadone (analgesico) propanololo (32) (beta-bloccante) antibiotici vari (32)	piperidina e derivati glutetimide (derivato del piperidinedione) carbamazepina

Tabella 5. Maggiori induttori, inibitori e substrati dell'isoenzima CYP2D6 (29,30).

Il gene *CYP2D6* è localizzato nel cromosoma 22, locus q13.1, all'estremità 3' del cluster *CYP2D*, a valle degli pseudogeni *CYP2D8P* e *CYP2D7P* (51). Il locus del gene *CYP2D6* è altamente polimorfico, fino ad ora sono state definite 75 varianti alleliche e oltre 30 sottovarianti (8), che differiscono tra loro per un insieme di cambiamenti in singole basi, inserzioni e delezioni nucleotidiche

o, ancora, per riarrangiamenti più importanti come duplicazioni e delezioni dell'intero gene (52). Attualmente sono stati individuati più di 130 fra SNPs ed altre tipologie di mutazioni.

1.3 SNPs e Farmacogenetica

I polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) sono il tipo di variazione genetica più comune nell'uomo, rappresentano infatti circa il 90% di tutti i polimorfismi (53) e sono presenti nella popolazione con una frequenza allelica $\geq 1\%$ e con una densità nel genoma umano di 1 ogni 1.000 basi (54-56). Sono per la maggior parte polimorfismi biallelici, ossia presenti in due forme alternative, e vengono ereditati in modo mendeliano. Attualmente i database pubblici (dbSNP) contengono circa 27 milioni di SNPs, 10 milioni dei quali sono stati validati ("rs" SNPs) (57). Anche se la maggior parte delle variazioni nel genoma umano sono neutre e non hanno dunque effetto sulla regolazione dell'espressione di geni o sulla loro funzione, gli SNPs presenti nelle regioni codificanti (cSNPs) e regolatorie dei geni possono, in alcuni casi, alterare la funzione genica (58), determinando variazioni nelle caratteristiche individuali come, appunto, una differente risposta ai farmaci o, ad esempio, una differente suscettibilità ad una malattia. Si stima che gli SNPs spieghino circa il 90% della variabilità genotipica individuale (55).

La relativa semplicità delle tecniche di analisi degli SNPs e la loro abbondanza nel genoma umano, li ha resi oggetto di ricerca frequente negli ultimi anni, infatti milioni di SNPs sono stati identificati nell'ambito del Progetto Genoma Umano e la maggior parte di essi sono stati organizzati grazie al Progetto Hap-Map (59), che ha permesso la scoperta di oltre 2 milioni di SNPs.

La crescente mole di dati disponibili sugli SNPs e su altri tipi di mutazioni geniche, ha contribuito a determinare la variabilità nel genoma, ma molto più complessa rimane la comprensione del significato funzionale di tali variazioni, in particolare nella farmacogenetica, area della genetica moderna che è strettamente focalizzata sullo studio dell'interazione tra geni e farmaci e si propone di individuare

variazioni di sequenza del DNA che correlano, la risposta positiva o negativa ad un farmaco o ad eventuali effetti collaterali.

Varianti funzionali causate da SNPs in geni codificanti enzimi metabolizzanti, trasportatori, canali ionici e recettori di farmaci sono state associate a variazioni interindividuali nella risposta farmacologica, accrescendo negli ultimi anni l'interesse verso tali geni (60). Infatti l'approfondimento delle conoscenze dei geni responsabili del metabolismo dei farmaci potrà permettere di migliorarne l'efficacia e la tollerabilità, personalizzando le terapie farmacologiche, specialmente quelle a maggiore rischio tossico. I campi di applicazione della farmacogenetica sono vari: cardiologia, pneumonologia, immunologia, psichiatria, neurologia, oncologia.

1.4 Tecnologia MALDI-TOF MS

Negli ultimi anni, la scoperta degli SNPs e lo sviluppo di metodi di genotipizzazione ad alta processività hanno permesso di tipizzare migliaia di marcatori presenti sul genoma alquanto rapidamente. Le tecnologie di genotyping degli SNPs hanno raggiunto un notevole progresso e sono state integrate da analisi su larga scala supportate dall'automazione (61,62).

Il primo test di farmacogenetica certificato per la diagnosi *in vitro* e approvato dalla Food and Drug Administration nel 2005, è stato sviluppato dalla collaborazione tra Affymetrix™ e Roche, la prima azienda che ha commercializzato i “chip a DNA”. Si tratta di un microarray (Figura 6) che permette di individuare simultaneamente, per ciascun soggetto, i 33 SNPs, le delezioni e le duplicazioni più frequenti dei geni *CYP2D6* e *CYP2C19*.



Figura 6. AmpliChip® CYP450 Test (Roche), per lo screening simultaneo di 33 SNPs e delle delezioni e duplicazioni più frequenti dei geni *CYP2D6* e *CYP2C19*.

Le tecnologie high-throughput, come appunto l'AmpliChip CYP450 GeneChip[®], anche se rapide ed affidabili, hanno lo svantaggio di essere estremamente dispendiose, mentre le tecniche comunemente usate, quali PCR-RFLP, Real-time PCR, PCR allele-specifica, Sequenziamento, etc., sono spesso laboriose e rilevano solo un ristretto numero di SNPs simultaneamente.

Una delle applicazioni più efficace, flessibile e relativamente meno dispendiosa per il genotyping high-throughput di polimorfismi è la Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI TOF MS) (Figura 7), in cui la discriminazione dei polimorfismi è realizzata tramite la diretta osservazione della massa (63).

L'applicazione si basa su una prima fase, in cui vengono generati dei frammenti SNPs-specifici di acido nucleico (4.000-8.600 Dalton range), tramite una PCR locus-specifica seguita da reazioni di primer mini-extension. In una seconda fase avviene l'analisi mediante MALDI TOF MS: i prodotti allele specifici, sono depositati con una matrice sulla superficie metallica di una piastra target (Figura 8). Un laser colpisce la matrice portando al dissorbimento delle molecole ed alla loro ionizzazione. Le molecole sono così accelerate lungo un tubo verso un detector situato al lato opposto. Quelle con una massa inferiore arriveranno in un tempo minore rispetto a quelle più pesanti, in questo modo avviene la separazione tra molecole di massa differente. Tramite l'utilizzo di un apposito software (Figura 9), viene registrato il tempo di volo di ogni molecola (TOF), che è direttamente proporzionale alla massa. Dopo l'analisi dei dati è prodotto uno spettro con l'intensità relativa nell'asse delle ordinate e la massa in Dalton nell'asse delle ascisse. L'analisi dello spettro fornisce il tipo di mutazione presente (64), indicata come omozigote wild type, omozigote mutato o eterozigote. Una sintesi dei diversi passaggi è schematizzata in figura 10.

I polimorfismi degli isoenzimi del CYP450 umano sono tra i più studiati tramite questa tecnica di analisi di SNPs. Il sempre crescente numero di varianti alleliche dei geni del CYP450, identificati e caratterizzati, ha indotto a standardizzarne la nomenclatura e a creare un sistema che permetta di essere

rapidamente aggiornati. Esiste a questo scopo un'importante risorsa disponibile in internet: il sito web CYP Allele Nomenclature Committee (8).



Figura 7. Piattaforma MALDI-TOF MS MassARRAY® (Sequenom®).

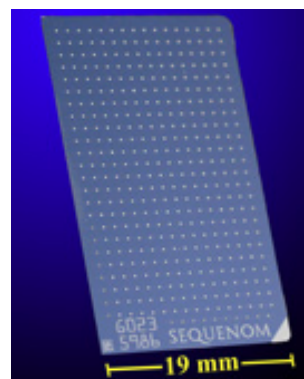


Figura 8. 384-spot SpectroChip (Sequenom®).

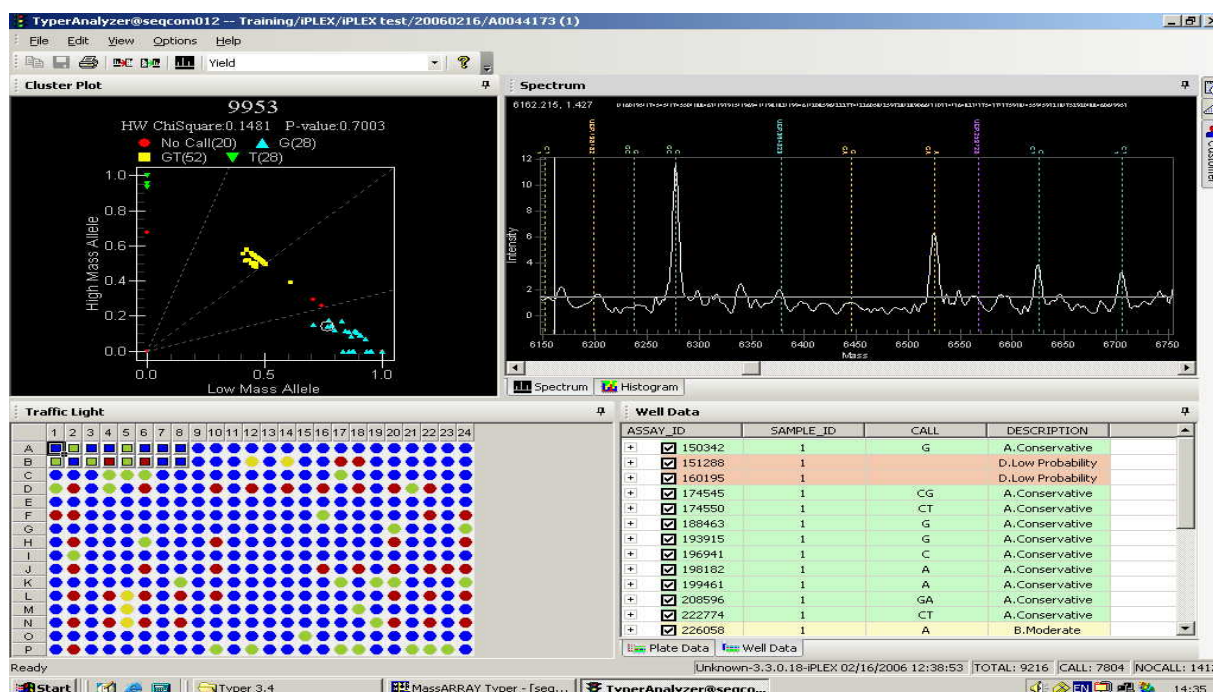


Figura 9. Software Sequenom Typer® MassARRAY RT™ version 3.3. Il software converte in tempo reale (1/3 secondi) i valori misurati (TOF e massa) per ciascun campione in genotipo, rilevando l'eventuale presenza del polimorfismo in condizioni di omo- o eterozigoti.

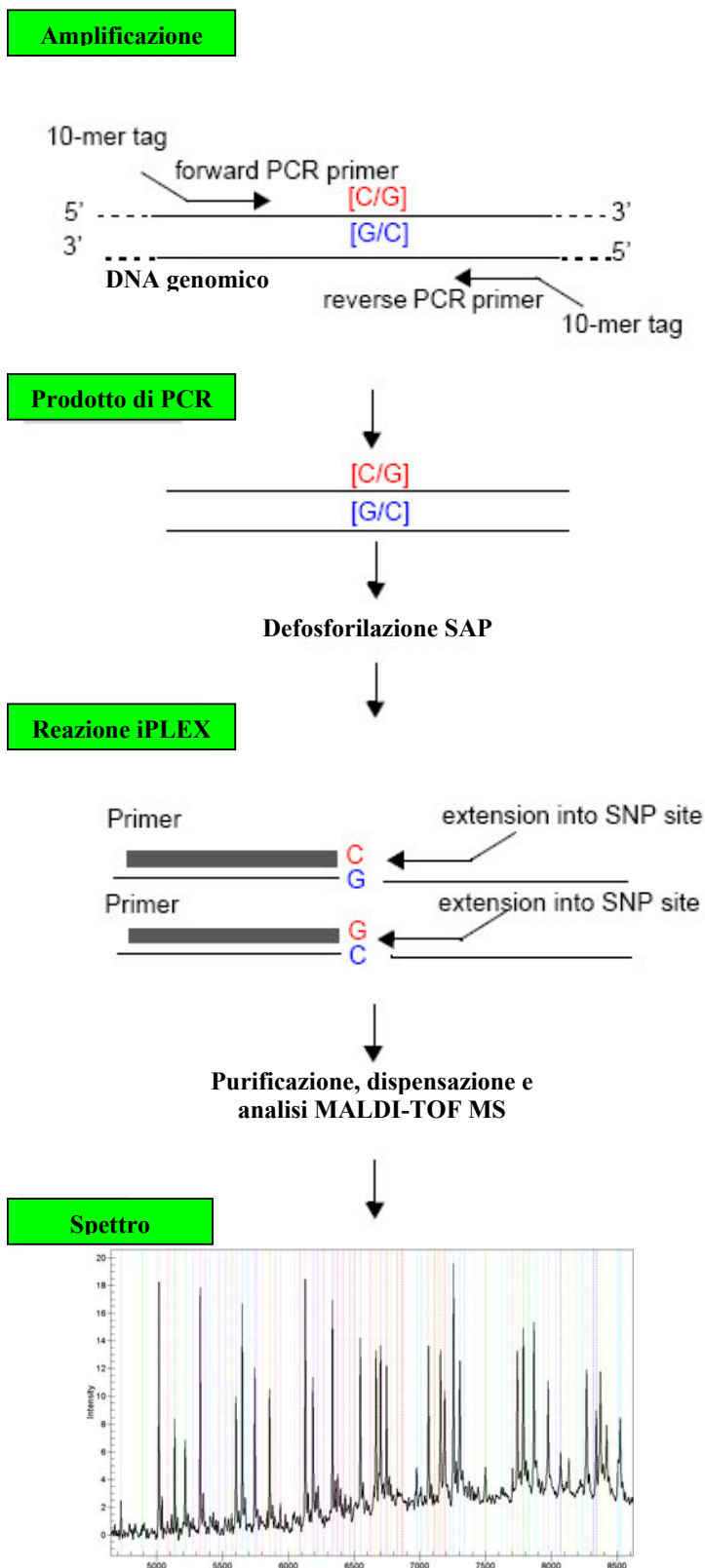


Figura 11. Schema dei diversi passaggi previsti dal protocollo iPLEX™ (72).

2. OBIETTIVI

Il primo obiettivo di questo lavoro di ricerca è la creazione di una piattaforma di indagine genetica che possa essere utilizzata come test di screening per pazienti sottoposti a trattamento con psicofarmaci, al fine di individuare ancor prima dell'inizio della cura, la concentrazione di farmaco più idonea da somministrare, in modo tale da evitare l'insorgenza di effetti collaterali dovuti ad una non idonea dose del farmaco o ad una interazione di tipo induttorio o inibitorio causata da una concomitante somministrazione di due o più farmaci.

Un test di screening efficace dovrebbe essere applicabile su larga scala ed in grado di selezionare in modo efficace una sottopopolazione su cui eseguire specifici test diagnostici (65), ma l'alta eterogeneità genetica rende difficile l'attuazione di uno screening di massa che invece può essere realizzabile in quelle popolazioni chiuse e a rischio per l'alto grado di consanguineità. Si tratta di comunità isolate con un'alta presenza di consanguineità, come può avvenire in popolazioni di zone montagnose, di gruppi religiosi o di isole. In Sardegna, per esempio, uno screening della popolazione è tecnicamente realizzabile e giustificabile (66,67).

Come secondo obiettivo ci si prefigge di trovare eventuali differenze nelle frequenze alleliche fra i campioni Sardi analizzati e la popolazione Caucasica di riferimento all'interno dei 5 geni appartenenti alla famiglia CYP450, oggetto dell'analisi. In caso di discordanze dalla popolazione di riferimento, il risultato ottenuto potrebbe dare indicazioni utili sulla scelta del trattamento psicofarmacologico iniziale in un in un individuo Sardo, anche in assenza di uno screening genetico pretrattamento.

3. MATERIALI & METODI

3.1 Popolazione studiata

La popolazione di controllo consiste di 250 soggetti non correlati fra loro ed originari della Sardegna, in apparente buono stato di salute e senza storie pregresse per malattie neoplastiche e/o degenerative. Per tutti i campioni è stato richiesto il consenso informato, rilasciato da ciascun individuo, all'utilizzo del proprio campione biologico per finalità di ricerca scientifica ed in modo anonimo. Tali campioni sono stati pertanto utilizzati, in forma del tutto anonima.

3.2 Estrazione del DNA e quantificazione

Il metodo di estrazione utilizzato prevede l'uso della tecnica del *Salting Out* (68) per la precipitazione e l'allontanamento delle proteine. Protocollo di estrazione:

- Ad ogni volume di sangue sono stati aggiunti 5 ml di soluzione di lisi per i globuli rossi, costituita da NaCl (Sigma-Aldrich[®]) allo 0,2%.
- I campioni sono stati agitati delicatamente per inversione, incubati a 4°C per 30 min e centrifugati per 15 min a 4°C a 1500 rpm.
- Il surnatante è stato eliminato salvando il pellet contenente i globuli bianchi.
- L'operazione è stata ripetuta per 2/3 volte.
- Per ogni 2 ml di sangue iniziale, è stato aggiunto un volume di soluzione di lisi per i globuli bianchi costituito da Tris 10 mM, EDTA 10 mM e NaCl-pH 8 100 mM (Sigma-Aldrich[®]).
- Per ogni ml di soluzione di lisi dei globuli bianchi sono stati aggiunti 65 µl di Sodiodecilsolfato (SDS) 20% e 20 µl di proteinasi K (Sigma-Aldrich[®]).
- I campioni sono stati agitati su vortex ed incubati per 15 min a 60°C.
- Per ogni ml di buffer di lisi dei globuli bianchi sono stati aggiunti 670 µl di NaCl saturo.

- I campioni sono stati agitati su vortex e centrifugati per 15 min a 4°C a 1500 rpm.
- Il DNA è stato fatto precipitare decantando il surnatante mediante aggiunta di due volumi di etanolo freddo.
- Il campione è stato mescolato per capovolgimento fino alla comparsa della “nuvoletta” di DNA, lavato con etanolo al 70% e lasciato asciugare all’aria.

Il DNA genomico estratto da questi campioni biologici è stato sciolto in 200 µl di tampone Tris HCl EDTA (TE) 0,2X (Invitrogen™) e successivamente conservato a -20°C. Per verificare l’avvenuta estrazione del DNA, è stata eseguita un’elettroforesi su gel di agarosio allo 0,8% (Invitrogen™) in tampone Tris Borato EDTA (TBE) 1X (Invitrogen™), colorato con SYBR® Gold nucleic acid gel stain (Invitrogen™) 1X. In ogni pozzetto è stato caricato 1 µl di DNA con 1 µl di tampone di carico BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen™) in acqua distillata, per un volume finale di 10 µl. Il DNA genomico, a migrazione avvenuta, è stato visualizzato tramite il transilluminatore Fujifilm Las-1000 analyzer (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH) come una banda fluorescente.

Per la quantizzazione spettrofotometrica, il DNA estratto, opportunamente diluito, è stato quantificato mediante lettura a 260 nm, lunghezza d’onda a cui specificamente assorbono gli acidi nucleici. Il rapporto tra l’assorbanza a 260 nm e a 280 nm, che deve essere compreso tra 1.7 e 2.0, ha fornito le indicazioni sul grado di contaminazione proteica del campione.

3.3 Selezione SNPs e sequenze

I criteri di selezione sono dipesi unicamente dagli effetti farmacogenetici descritti per ogni SNP nella popolazione Caucasiaca. Gli SNPs sono stati selezionati utilizzando due fra i principali SNP web databases, “The Human CYP allele nomenclature committee website” (8) e “NCBI Single Nucleotide Polymorphism dbSNP” (69). Una sequenza di 400 base pairs (bp) fiancheggiante ogni SNP selezionato, è stata scaricata dalla corrispondente sequenza genomica depositata nei databases pubblici “NCBI

Single Nucleotide Polymorphism dbSNP” (69) e “Ensembl Genome Browser” (70) ed è stata analizzata col software Vector NTI Suite version 5.5 (InforMax[®]). Tutte le sequenze selezionate sono state sottoposte ad un’analisi BLAST online (71) per escludere la presenza di sequenze omologhe.

3.4 Analisi MALDI-TOF MS

La tecnologia utilizzata per lo screening e l’analisi dei polimorfismi selezionati per ciascuno dei 250 campioni di DNA estratto, si basa sulla misura del tempo di volo dei prodotti di mini-sequenziamento del DNA genomico amplificato tramite reazioni PCR (Polymerase Chain Reaction) di tipo multiplex, utilizzando la piattaforma medium-throughput MALDI-TOF MS MassARRAY[®] (Sequenom[®]) (Figura 7) e seguendo il protocollo iPLEX[™] Gold (72). Questa piattaforma utilizza la tecnologia dei “saggi multipli” o “multiplexed assays”, che consente di analizzare contemporaneamente fino a 30 polimorfismi per ogni campione di DNA e sino a 384 campioni di DNA in contemporanea (oltre 10.000 SNPs in simultanea), riducendo così, in maniera considerevole, i tempi delle analisi. Inoltre, la raccolta dei dati nel MALDI-TOF è rapida e automatizzata e viene effettuata in tempo reale. Il protocollo iPLEX[™] Gold prevede diversi passaggi preliminari:

- Disegno dei primers per l'amplificazione di ciascun SNP mediante multiplex-PCR. La costruzione degli oligonucleotidi prevede un'analisi preliminare delle sequenze tramite allineamento (BLAST) (71) sull'intero genoma umano e riformattazione delle sequenze in modo da demarcare eventuali polimorfismi noti che siano localizzati in prossimità del polimorfismo da genotipizzare.
- Disegno dei multiplexed assays con il software Assay Design[®] version 3.1 (Sequenom[®]). Per ciascun polimorfismo vengono generati tre primers: due primers per la reazione di PCR caratterizzati all'estremità 5' da sequenza-tag di 10 bp (5'-ACGTTGGATG-3') che consentono di migliorare la resa di ogni reazione PCR; un primer UEP (UnExtended Primer) per la reazione di estensione di una singola

base dell'oligonucleotide (Single Base Primer Extension o SBE) la cui sequenza termina esattamente una base prima del sito polimorfico di interesse.

- Set up delle reazioni di PCR dei singoli assay, nel quale vengono testati i saggi multipli elaborati nel punto precedente, al fine di verificare la compatibilità dei singoli primers all'interno delle reazioni di multiplex-PCR e quindi evitare l'insorgere di risultati nulli o falsati.

Al fine di ottenere il maggior livello di multiplexing possibile, sono state testate varie combinazioni di primers, che hanno portato al disegno finale costituito da due piattaforme di screening per caratterizzare i maggiori SNPs clinicamente rilevanti nella popolazione Caucasica presenti nei geni *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9*, *CYP2C19* e *CYP2D6*:

- Una piattaforma multigenica dedicata allo screening di 45 polimorfismi presenti nei geni *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9* e *CYP2C19* assemblati in 3 reazioni multiplex (8-, 16- e 21-plex). La lista degli SNPs e degli alleli associati è mostrata in tabella 6, mentre in tabella 7 e 8 vengono riportati i primers di PCR e UEP, con le relative masse, estrapolati dal software Assay Design[®].
- Una piattaforma monogenica dedicata allo screening di 66 polimorfismi del gene *CYP2D6*. I polimorfismi sono stati raggruppati in 5 reazioni multiplex. (12-, 13-, 13-, 14- e 14-plex). La lista degli SNPs e degli alleli associati è mostrata in tabella 9, mentre in tabella 10 vengono riportati i primers UEP, con le relative masse, estrapolati dal software Assay Design[®].

Non tutti gli SNPs selezionati sono responsabili di una variazione a livello aminoacidico o trascrizionale (Tabella 11), alcuni risultano essere silenti, ma sono stati inseriti nello studio in quanto fondamentali per la ricostruzione degli aplotipi. Inoltre sono stati inseriti nello studio anche le più frequenti delezioni e inserzioni nucleotidiche presenti nella popolazione Caucasica.

<i>CYP3A4</i>	<i>*1A</i>	<i>*1B</i>	<i>*1C</i>	<i>*1D</i>	<i>*1F</i>	<i>*2</i>	<i>*3</i>	<i>*7</i>	<i>*8</i>	<i>*11</i>	<i>*12</i>	<i>*15A</i>	<i>*15B</i>	<i>*17</i>
-747C>G	C	C	C	C	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C
-444T>G	T	T	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
-392A>G	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A
-62C>A	C	C	C	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
6004G>A	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G
13908G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G
14269G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	A	G
15615T>C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C
15713T>C	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T
21867C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C
21896C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C
23171T>C	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T

<i>CYP3A5</i>	<i>*1A</i>	<i>*1C</i>	<i>*1D</i>	<i>*2</i>	<i>*3A</i>	<i>*3B</i>	<i>*3E</i>	<i>*3K</i>
-74C>T	C	T	C	C	C	C	C	C
3705C>T	C	C	C	C	C	T	C	C
3709_3710 insG	-	-	-	-	-	G	-	-
6986A>G	A	A	A	A	G	G	G	G
27050A>G	A	A	A	A	A	A	G	A
27289C>A	C	C	C	A	C	C	C	C
29753T>C	T	T	T	T	T	T	T	C
31611C>T	C	C	T	C	T	T	T	T

<i>CYP2C9</i>	<i>*1A</i>	<i>*1B</i>	<i>*1C</i>	<i>*1D</i>	<i>*2A</i>	<i>*2B</i>	<i>*2C</i>	<i>*3A</i>	<i>*3B</i>
-2665_-2664 delTG	TG	-	TG	-	TG	-	TG	TG	TG
-1911T>C	T	T	T	T	T	T	T	C	C
-1885C>G	C	C	C	C	C	C	C	G	G
-1537G>A	G	G	G	G	G	G	G	A	A
-1188T>C	T	C	C	T	C	C	T	T	C
-1096A>G	A	A	A	A	G	G	G	A	A
-981G>A	G	G	G	G	G	G	G	A	A
-620G>T	G	G	G	G	T	T	T	G	G
-484C>A	C	C	C	C	A	A	A	C	C
3608C>T	C	C	C	C	T	T	T	C	C
42614A>C	A	A	A	A	A	A	A	C	C

<i>CYP2C19</i>	<i>*1A</i>	<i>*1C</i>	<i>*2A</i>	<i>*2B</i>	<i>*3</i>	<i>*4</i>	<i>*5A</i>	<i>*5B</i>	<i>*6</i>	<i>*7</i>	<i>*8</i>	<i>*10</i>	<i>*17</i>	<i>*27</i>
-3402C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C
-1041A>G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G
-806C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C
1A>G	A	A	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A
12460G>C	G	G	G	C	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
12748G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G
17948G>A	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
19153C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C
19154G>A	G	G	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
19294T>A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	A	T	T	T	T
12711T>C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T
80160C>T	C	C	T	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
80161A>G	A	G	G	G	G	G	A	G	G	A	A	G	G	G
90033C>T	C	C	C	C	C	C	T	T	C	C	C	C	C	C

Tabella 6. Lista dei polimorfismi inclusi nei 3 saggi multipli della piattaforma multigenica ed alleli ad essi associati. SNPs ed alleli sono evidenziati in rosso (del=delezione; ins=inserzione).

21-plex	sequenza primers Forward	sequenza primers Reverse
CYP2C19_90033C>T	ACGTTGGATGGTGCCAGTTATAGAGACAGT	ACGTTGGATGTAAAAACAGCTCCATGCGGG
CYP3A5_3705C>T	ACGTTGGATGACCTGACGATAGGACAAAAC	ACGTTGGATGTCCCTGTGACCTGATTTCTG
CYP2C9_-2665_-2664delTG	ACGTTGGATGTGTTGCCAGAAACCCCAAAC	ACGTTGGATGCTCAGTCCAAATGATCAGGG
CYP2C19_12711T>C	ACGTTGGATGAGCGGGCTTCCTCTTGAAC	ACGTTGGATGTCTGTTAGGAATCGTTTTTC
CYP2C19_12460G>C	ACGTTGGATGCTGTATTTTGGCCTGGAACG	ACGTTGGATGCTCTGTTAGCTCTTTTCAGCC
CYP3A4_15615T>C	ACGTTGGATGGAAGGATGGTAAAAAGGTGC	ACGTTGGATGGTGGATTGTTGAGAGAGTCG
CYP3A5_27289C>A	ACGTTGGATGTTCCCAAAGGGTCAATGGTG	ACGTTGGATGGTCAGGGTGAGCTCCATTTC
CYP3A5_27050A>G	ACGTTGGATGCACTGAGCACATCAATGGAC	ACGTTGGATGACTCTCAACTGAGTCCATGC
CYP3A4_21867C>T	ACGTTGGATGTCTTTTTTGCAGACCCTCTC	ACGTTGGATGGTTTCGTCTTTCCAGGCAC
CYP2C19_-806C>T	ACGTTGGATGTGAGGTCTTCTGATGCCAT	ACGTTGGATGGGAAGTTGTTTTGTTTTGC
CYP3A5_29753T>C	ACGTTGGATGTGAAGGACTCTGATTAGAGC	ACGTTGGATGGGTTTCAGTAAGAAGAAGGAC
CYP2C19_-1041A>G	ACGTTGGATGTATCTAAGGAAAACAGCCCC	ACGTTGGATGCCCTAGCACCAAATTCTCTG
CYP2C9_-1537G>A	ACGTTGGATGGAATTGTTACACCTCATGTC	ACGTTGGATGAGCAGACAGCATGTTCTTGG
CYP3A5_31611C>T	ACGTTGGATGGAAATCTCTGGTGTCTGGG	ACGTTGGATGTCTTCAACCAGAAAAACCC
CYP3A4_15713T>C	ACGTTGGATGGGAAATAGTAGTCCACATAC	ACGTTGGATGGACTCTCTCAACAATCCAC
CYP3A4_6004G>A	ACGTTGGATGTCATCCCAATTAGAGGCAGG	ACGTTGGATGACTCACCCCCACACTTTTCC
CYP2C9_-1911T>C	ACGTTGGATGGTAAGTCAAAGGCCCTTGGAG	ACGTTGGATGGCAACCGAGCTTATTTTACC
CYP3A4_-62C>A	ACGTTGGATGGAGAGCCATCACTACTTTCC	ACGTTGGATGACAGCCTCACTGAATCACTG
CYP2C9_42614A>C	ACGTTGGATGAACTTACCTTGGGAATGAGA	ACGTTGGATGCCACATGCCCTACACAGATG
CYP3A5_6986A>G	ACGTTGGATGATGTACCACCCAGCTTAACG	ACGTTGGATGACCAAGGCTTCATATGATG
CYP3A4_13908G>A	ACGTTGGATGCATACCTCCTTGAGTTTCC	ACGTTGGATGACTCTAGCCTTTTGGTCCAG

16-plex	sequenza primers Forward	sequenza primers Reverse
CYP2C9_-981G>A	ACGTTGGATGGTCTCTAAGGGAAACAGCAC	ACGTTGGATGTTCCTCAGTTACACTGAGC
CYP2C9_-1188T>C	ACGTTGGATGTATGGACAGAACACAGTTG	ACGTTGGATGACATTGTGGTGGTTCTGTGC
CYP2C19_12748G>A	ACGTTGGATGGGAATCGTTTTCAGCAATGG	ACGTTGGATGGTCCTCAATGCTCCTCTTCC
CYP2C19_17948G>A	ACGTTGGATGAACATCAGGATTGTAAGCAC	ACGTTGGATGATGTACTTCAGGGCTTGGTC
CYP3A4_14269G>A	ACGTTGGATGCCAGTATGGAGATGTGTTGG	ACGTTGGATGTTTCATGACAGCTCAGAACCC
CYP2C19_80160C>T	ACGTTGGATGCACCACAGCATCTGTGTAGG	ACGTTGGATGGTCAGCTAAAGTCCAGGAAG
CYP2C9_-1885C>G	ACGTTGGATGTTTCATGAGTCAGGGACCAAG	ACGTTGGATGGAGAGGTCAGAAGAGTTTGG
CYP3A4_-444T>G	ACGTTGGATGAGGAACCTGTGAGAAGATGC	ACGTTGGATGAAAATAGAAAGCCCAGGGAC
CYP3A4_23171T>C	ACGTTGGATGAAGGAGAAGTTCTGAAGGAC	ACGTTGGATGTACACACCCTTTGGAAGTGG
CYP3A5_3709_3710insG	ACGTTGGATGTTTCCCAACAAAGGCAGAGG	ACGTTGGATGTCCCTGTGACCTGATTTCTG
CYP2C19_19153C>T	ACGTTGGATGTCCATCGATTCTTGGTGTTT	ACGTTGGATGGCAATAATTTTCCCACTATC
CYP2C9_-620G>T	ACGTTGGATGGGTCTCCCTTTTCCATTG	ACGTTGGATGCCCTAGCAGATATAAACAC
CYP2C19_19294T>A	ACGTTGGATGTACGCAAGCAGTCACATAAC	ACGTTGGATGGATGGACATCAACAACCCTC
CYP2C19_-3402C>T	ACGTTGGATGAAAAATGGGCAACGGGTCTG	ACGTTGGATGATCGGGGTTTCTAGCTGCAG
CYP2C9_-484C>A	ACGTTGGATGGGCTGCTGTATTTTCTAGTAGG	ACGTTGGATGTGGCCATATTCTATGCCTTG
CYP2C19_1A>G	ACGTTGGATGGAGCACAAAGGACCACAAAAG	ACGTTGGATGCATCAAAGAGGCACACACAC

8-plex	sequenza primers Forward	sequenza primers Reverse
CYP2C19_80161A>G	ACGTTGGATGATGTGGCCCCCTGCTCGCAT	ACGTTGGATGGTCAGCTAAAGTCCAGGAAG
CYP2C9_3608C>T	ACGTTGGATGGTAAGGTCAGTGATATGGAG	ACGTTGGATGCATGACGCTGCGGAATTTTG
CYP3A4_21896C>T	ACGTTGGATGATGAACATCCCATTTGATCTC	ACGTTGGATGGCTCAGATTATTCCCAATTGC
CYP3A4_-392A>G	ACGTTGGATGACCTGACGCAGGTGGTCCCT	ACGTTGGATGGCAAGATTCCATTCAAAAAC
CYP2C9_-1096A>G	ACGTTGGATGAGTCACCTCCAGACATGGC	ACGTTGGATGGCTTCTGTGCATTATTAC
CYP2C19_19154G>A	ACGTTGGATGCTTTCCATAAAAGCAAGGTT	ACGTTGGATGGCAATAATTTTCCCACTATC
CYP3A4_-747C>G	ACGTTGGATGCTCAAGGGCATAGTCTAGTC	ACGTTGGATGCTAGTTGCCCACTGTGTGTA
CYP3A5_-74C>T	ACGTTGGATGTAGCTGAGTGCTGCTGTTG	ACGTTGGATGTCAGCAGCTTGGCTGAAGAC

Tabella 7. Sequenze dei primers di PCR inclusi nei 3 saggi multipli della piattaforma multigenica, estrapolati dal software Assay Design[®] version 3.1 (Sequenom[®]).

21-plex	sequenza UEPs	Massa
CYP2C19_90033C>T	TCTCCCACACAAATCC	4730
CYP3A5_3705C>T	ATATGGGACCCGTACA	4890
CYP2C9_-2665_-2664delTG	CAACATTAAGCCCTCCA	5083
CYP2C19_12711T>C	TCAGCAATGGAAAGAGA	5277
CYP2C19_12460G>C	GCCTCTTCCAGAAACTC	5404
CYP3A4_15615T>C	GAGTCGATGTTCCTCCA	5475
CYP3A5_27289C>A	TCATGGTGAAGAGCATAA	5572
CYP3A5_27050A>G	TTGAGTCCATGCAGTACTA	5803
CYP3A4_21867C>T	GACATGGTGGTGAATGAAA	5941
CYP2C19_-806C>T	TGTGTCTTCTGTTCTCAAAG	6089
CYP3A5_29753T>C	GAAATGCATTGGCATGAGGT	6221
CYP2C19_-1041A>G	ATGCCCTTCAGTTACACTGAGC	6381
CYP2C9_-1537G>A	TGGGTCAATTTTATTGTAAGCA	6779
CYP3A5_31611C>T	GGAGAATGAGTTATTCTAAGGA	6863
CYP3A4_15713T>C	GTTGTTTGGATCCATTCTTCTC	6978
CYP3A4_6004G>A	CTGCCATGTCAAACATACAAAAG	7010
CYP2C9_-1911T>C	TTTAATGAGTCAGGGACCAAGTTA	7416
CYP3A4_-62C>A	GGACAGCTCCATGCACATAGCCCAG	7621
CYP2C9_42614A>C	ACGGGGTGCACGAGGTCCAGAGATAC	8070
CYP3A5_6986A>G	AAGGTGGTCCAAACAGGGAAGAGATA	8126
CYP3A4_13908G>A	AAAAGATGAAGAATGGAAGAGATTAC	8133

16-plex	sequenza UEPs	Massa
CYP2C9_-981G>A	CTTCTGCAGTGATGGA	4912
CYP2C9_-1188T>C	TCCCTACCTCCCATCTT	4992
CYP2C19_12748G>A	TCCCATCCCAAAATTC	5034
CYP2C19_17948G>A	CTTGGCCTTACCTGGAT	5152
CYP3A4_14269G>A	GGGCCTGTCTCTGCTTCC	5434
CYP2C19_80160C>T	GGAAGAGATTGAACGTGT	5628
CYP2C9_-1885C>G	AGGCAAAGGCCTTGAGAA	5911
CYP3A4_-444T>G	GACACACCTTTTCTTGTC	5994
CYP3A4_23171T>C	ACCAAGAACTGCATTGGCA	6119
CYP3A5_3709_3710insG	AATTGGACCCGTACACATGG	6126
CYP2C19_19153C>T	CCCCTATCATTGATTATTTCC	6595
CYP2C9_-620G>T	GAGCAGATATAAACACCTTTAC	6711
CYP2C19_19294T>A	GGACTGATCAAAATGGAGAAGG	6882
CYP2C19_-3402C>T	CCCTTGATGTCTTCTTGTTGAG	7028
CYP2C9_-484C>A	TAGGAGACTTTGTTCTTTATAAT	7059
CYP2C19_1A>G	TCTGAACAAGAGGAGAAGGCTTCA	7435

8-plex	sequenza UEPs	Massa
CYP2C19_80161A>G	GCTCCGGTTTCTGCCAA	5137
CYP2C9_3608C>T	AGAGGAGCATTGAGGAC	5308
CYP3A4_21896C>T	CTTTTGCAGACCCTCTCAA	5699
CYP3A4_-392A>G	GCAGGTGGTCCCTGGGCTT	5852
CYP2C9_-1096A>G	CTCCAGACATGGCTGCTTTC	6044
CYP2C19_19154G>A	GGAGTAATTTGTTATGGGTTCC	6811
CYP3A4_-747C>G	CAAGGGCATAGTCTAGTCTTATTC	7343
CYP3A5_-74C>T	ATTGCTGCTGTTTGCTGGGCTGTTT	7692

Tabella 8. Sequenze e massa molecolare, espressa in Dalton, dei primers UEP inclusi nei 3 saggi multipli della piattaforma multigenica, estrapolati dal software Assay Design[®] version 3.1 (Sequenom[®]).

<i>CYP2D6</i>	<i>*1A</i>	<i>*1B</i>	<i>*1D</i>	<i>*1E</i>	<i>*2A</i>	<i>*2B</i>	<i>*2D</i>	<i>*2E</i>	<i>*2F</i>	<i>*2G</i>	<i>*2K</i>	<i>*2L</i>	<i>*2M</i>
-1584C>G	C	C	C	C	G	C	C	C	C	C	C	C	C
-1426C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
-1235A>G	A	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	G	G
-1000G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
-750 -749delGA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	del
-740C>T	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C	T	T
-678G>A	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	A
19G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
31G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
77G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
82C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
100C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
124G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
137 138insT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
214G>C*	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
310G>T	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	T	T
746C>G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	G	G
843T>G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	G	G
883G>C	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
957C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
974C>A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
984A>G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
997C>G	C	C	C	C	C	C	C	G	C	C	C	C	C
1039C>T	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C	C
1513C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C
1659G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1661G>C	G	G	G	G	C	C	G	C	C	C	C	C	C
1704C>G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1707delT	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1724C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C
1749A>G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
1757C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C
1758G>T>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1846G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1863_1864 insTTTCGCCCC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1869T>C	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1943G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1979T>C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
2291G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
2483G>T	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
2539_2542delAACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT
2549delA	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2575C>A	C	C	A	C	C	C	C	C	C	A	C	C	C
2587_2590delGACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT
2615_2617delAAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG
2850C>T	C	C	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T
2853A>C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2935A>C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2939G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
2988G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3183G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3198C>G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
3277T>C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
3288G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3384A>C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	C
3582A>G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3584G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	A
3790C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	T
3828G>A	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3853G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3877G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
4115C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C
4155C>T°	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
4180G>C	G	G	G	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C
4401C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
4481G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A

Tabella 9. Lista dei polimorfismi inclusi nei 5 saggi multipli della piattaforma monogenica dedicata al gene *CYP2D6*, ed alleli ad essi associati. SNPs ed alleli sono evidenziati in rosso.

*Lo SNP 214G>C è stato analizzato per discriminare la conversione genica con lo pseudogene *CYP2D7P* nell'introne 1;
°Lo SNP 4155C>T è stato analizzato per discriminare la conversione genica con lo pseudogene *CYP2D7P* nell'esone 9 (del=delezione; ins=inserzione).

<i>CYP2D6</i>	<i>*3A</i>	<i>*3B</i>	<i>*4A</i>	<i>*4B</i>	<i>*4D</i>	<i>*4K</i>	<i>*4L</i>	<i>*4M</i>	<i>*4N</i>	<i>*5</i>	<i>*6A</i>	<i>*6C</i>	<i>*6D</i>
-1584C>G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
-1426C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C
-1235A>G	A	A	A	A	A	A	A	G	G	A	A	A	A
-1000G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G
-750_-749delGA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA
-740C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
-678G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
19G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
31G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
77G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
82C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
100C>T	C	C	T	T	T	T	T	C	T	C	C	C	C
124G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
137_138insT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
214G>C	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
310G>T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	G	G	G
746C>G	C	C	C	C	C	C	C	G	G	C	C	C	C
843T>G	T	T	T	T	T	T	T	G	G	T	T	T	T
883G>C	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
957C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
974C>A	C	C	A	A	C	C	C	A	A	C	C	C	C
984A>G	A	A	G	G	A	A	A	G	G	A	A	A	A
997C>G	C	C	G	G	C	C	G	G	G	C	C	C	C
1039C>T	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C
1513C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1659G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1661G>C	G	G	C	G	C	C	C	C	C	G	G	G	G
1704C>G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1707delT	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	del	del	del
1724C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1749A>G	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
1757C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1758G>T>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1846G>A	G	G	A	A	A	A	A	A	A	G	G	G	G
1863_1864 insTTTCGCCCC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1869T>C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1943G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1979T>C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
2291G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
2483G>T	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
2539_2542delAACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT
2549delA	del	del	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2575C>A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
2587_2590delGACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT
2615_2617delAAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG
2850C>T	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C	C
2853A>C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2935A>C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2939G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
2988G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3183G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3198C>G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
3277T>C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
3288G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
3384A>C	A	A	A	A	A	A	A	C	C	A	A	A	A
3582A>G	A	A	A	A	A	A	A	G	G	A	A	A	A
3584G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3790C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
3828G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3853G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3877G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
4115C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
4155C>T°	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C
4180G>C	G	G	C	C	C	C	C	G	C	G	G	C	G
4401C>T	C	C	C	C	C	C	C	T	T	C	C	C	C
4481G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G

Tabella 9. Continua...2

<i>CYP2D6</i>	<i>*7</i>	<i>*8</i>	<i>*9</i>	<i>*10A</i>	<i>*10B</i>	<i>*11</i>	<i>*12</i>	<i>*14A</i>	<i>*14B</i>	<i>*15</i>	<i>*17</i>	<i>*19</i>	<i>*20</i>
-1584C>G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
-1426C>T	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C
-1235A>G	A	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A
-1000G>A	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G
-750_-749delGA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA
-740C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
-678G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
19G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
31G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
77G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
82C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
100C>T	C	C	C	T	T	C	C	T	C	C	C	C	C
124G>A	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G
137_138insT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-
214G>C	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
310G>T	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
746C>G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
843T>G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
883G>C	G	G	G	G	G	C	G	G	G	G	G	G	G
957C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
974C>A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
984A>G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
997C>G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1039C>T	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C
1513C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1659G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1661G>C	G	C	G	C	C	C	C	G	C	G	C	C	C
1704C>G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1707delT	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1724C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1749A>G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
1757C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1758G>T>A	G	T	G	G	G	G	G	A	A	G	G	G	G
1846G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1863_1864 insTTTCGCCCC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1869T>C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1943G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1979T>C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C
2291G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
2483G>T	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
2539_2542delAACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	del	AACT
2549delA	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2575C>A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
2587_2590delGACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT
2615_2617delAAG	AAG	AAG	del	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG
2850C>T	C	T	C	C	C	T	T	T	T	C	T	T	T
2853A>C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2935A>C	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2939G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
2988G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3183G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3198C>G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
3277T>C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
3288G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3384A>C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3582A>G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3584G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3790C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
3828G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3853G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3877G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
4115C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
4155C>T°	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
4180G>C	G	C	G	C	C	C	C	C	C	G	C	C	C
4401C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
4481G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G

<i>CYP2D6</i>	<i>*22</i>	<i>*23</i>	<i>*24</i>	<i>*25</i>	<i>*26</i>	<i>*27</i>	<i>*28</i>	<i>*29</i>	<i>*30</i>	<i>*31</i>	<i>*32</i>	<i>*33</i>
-1584C>G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
-1426C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
-1235A>G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
-1000G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
-750_-749delGA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA
-740C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
-678G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
19G>A	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G
31G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
77G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
82C>T	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
100C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
124G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
137_138insT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
214G>C	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
310G>T	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
746C>G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
843T>G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
883G>C	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
957C>T	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
974C>A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
984A>G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
997C>G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1039C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1513C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1659G>A	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G
1661G>C	G	G	G	G	G	G	C	C	C	C	C	G
1704C>G	C	C	C	C	C	C	G	C	C	C	C	C
1707delT	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1724C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1749A>G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
1757C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1758G>T>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1846G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1863_1864 insTTTCGCCCC	-	-	-	-	-	-	-	-	TTTCGCCCC	-	-	-
1869T>C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1943G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1979T>C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
2291G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
2483G>T	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	T
2539_2542delAACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT
2549delA	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2575C>A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
2587_2590delGACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT
2615_2617delAAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG
2850C>T	C	C	C	C	C	C	T	T	T	T	T	C
2853A>C	A	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2935A>C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2939G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
2988G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3183G>A	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G
3198C>G	C	C	C	G	C	C	C	C	C	C	C	C
3277T>C	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T
3288G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3384A>C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3582A>G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3584G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3790C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
3828G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3853G>A	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	A	G
3877G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
4115C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
4155C>T°	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
4180G>C	G	G	G	G	G	G	C	C	C	C	C	G
4401C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
4481G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G

Tabella 9. Continua...4

<i>CYP2D6</i>	<i>*35A</i>	<i>*36</i>	<i>*37</i>	<i>*38</i>	<i>*39</i>	<i>*41</i>	<i>*43</i>	<i>*58</i>	<i>*59</i>	<i>*64</i>	<i>*65</i>
-1584C>G	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
-1426C>T	C	T	C	C	C	C	C	T	C	T	C
-1235A>G	A	G	A	A	A	G	A	G	A	G	A
-1000G>A	G	A	G	G	G	G	G	G	G	A	G
-750_-749delGA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA
-740C>T	C	C	C	C	C	T	C	T	C	C	C
-678G>A	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G
19G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
31G>A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
77G>A	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G
82C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
100C>T	C	T	T	C	C	C	C	C	C	T	T
124G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
137_138insT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
214G>C	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
310G>T	G	T	G	G	G	G	G	T	G	T	T
746C>G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
843T>G	T	G	T	T	T	T	T	G	T	G	G
883G>C	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
957C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
974C>A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
984A>G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
997C>G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1039C>T	C	T	T	C	C	C	C	C	C	C	C
1513C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1659G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1661G>C	C	C	C	G	C	C	G	G	C	C	C
1704C>G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1707delT	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1724C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1749A>G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
1757C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1758G>T>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1846G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1863_1864 insTTTCGCCCC	-	-	-	-	-	-	-	TTTCGCCCC	-	-	-
1869T>C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1943G>A	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G
1979T>C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
2291G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G
2483G>T	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
2539_2542delAACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT
2549delA	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2575C>A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
2587_2590delGACT	GACT	GACT	GACT	del	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT	GACT
2615_2617delAAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG	AAG
2850C>T	T	C	C	C	C	T	C	T	T	C	T
2853A>C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2935A>C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2939G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G
2988G>A	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G
3183G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3198C>G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
3277T>C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
3288G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3384A>C	A	C	A	A	A	A	A	C	A	C	C
3582A>G	A	G	A	A	A	A	A	A	A	G	A
3584G>A	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G	A
3790C>T	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	T
3828G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3853G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3877G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
4115C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
4155C>T°	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C
4180G>C	C	G	C	G	C	C	G	C	C	C	C
4401C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C
4481G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A

Tabella 9. Continua...5

13-PLEX	Sequenza UEPs	Massa
1661G>C	CAGAGGCGCTTCTCCGT	5162
1869T>C	ACGGCTTTGTCCAAGAG	5210
1846G>A	GGGGCGAAAGGGGCGTC	5342
214G>C	TGGAGGGCGGCAGAGGT	5357
19G>A	CTGGGGCTAGAAGCACTG	5565
1707delT	GCGGCCTCCTCGGTCACCC	5702
746C>G	GCGACCCAGCCTCCTGATC	5710
997C>G	GAACAGGCGGGCGGTCGGC	5920
100C>T	AATGCTGGGCTGCACGTAC	6118
1979T>C	GGACAGCCCGACTCCTCCTTC	6303
1749A>G	GCCCATCACCCACCGAGTGGT	6681
77G>A	GTAGCGTGCAGCCAGCGTTGG	6792
1513C>T	AGCTGGACAGAGCCAGGGACTG	6835

13-PLEX	Sequenza UEPs	Massa
984A>G	GCGAGTGTCTCGCCG	4874
1863_1864ins TTTCGCCCC	GACGCCCCCTTCGCCCC	5043
1039C>T	ACCCAGATCTGGGTTT	5161
1943G>A	CCAGCAGCCTGAGGAAG	5229
974C>A	CGGCCGTGCGCGAGGCG	5253
1704C>G	GGCAAGAAGTCGCTGGAG	5614
310G>T	TAAATGCCCTTCTCCAGGA	5748
957C>T	GTCGTGCTCAATGGGCTGG	5876
883G>C	TCCCCGAAGCGGCGCCGCAA	6073
1659G>A	CGCGAGCAGAGGCGCTTCTCC	6408
31G>A	AGCAGGAAGATGGCCACTATCA	6777
1724C>T	GCGAAGGCGGCACAAAGGCAGGC	7158
124G>A	TCACATGCAGCAGGTTGCCAGCC	7299

14-PLEX	Sequenza UEPs	Massa
3198C>G	ACCCATCTCTGGTCGCC	5082
2549delA	TGGGTCCCAGGTCATCC	5162
3582A>G	GAATGTTGGAGGACCCA	5259
2539_2542delAACT	ACAGCTGGATGAGCTGCT	5540
3790C>T	CCACTCTCACCTGCATCT	5620
4115C>T	ACCTCCTGTGTCAGCACTT	5989
4481G>A	GAATCTGACTGCCCAGATTG	6117
3828G>A	ACTCATCACCAACCTGTCATC	6270
3384A>C	CATGCTGGGGCTATCACCAGG	6447
2853A>C	GAGAACAGGTCAGCCACCACTA	6722
2988G>A	CATGTGCCCCCGCCTGTACCCTT	6886
3584G>A	GTCAGAATGTTGGAGGACCCAAC	7098
4401C>T	TAACTGACATCTGCTCAGCCTCAAC	7546
2587_2590delGACT	ATCAGCTCAGCCCCCGAGACCTGA	7846

14-PLEX	Sequenza UEPs	Massa
-1235A>G	GCACCACCCAGCCTAAT	5084
137_138insT	GAAGTCCACATGCAGCA	5188
4155C>T	CAGCCCCGGCCAGCCAC	5376
82C>T	GTGTAGCGTGCAGCCCAGC	5830
-1584C>G	CTGGACAACCTGGAAGAACC	6135
2575C>A	GACCTGGGACCCAGCCAGCC	6362
843T>G	ACTAGGACCTGTAGTCTGGGG	6502
-740C>T	ACAGACTCACACTGACACTTAG	6672
-678G>A	CTTTGTGTGGGTGATTTCTGC	6769
-750_-749delGA	TGTGACTGGTGTGTGTGAGAGA	6902
2291G>A	CACTCGCCAAGTGCCAGCCTCCAC	7204
-1426C>T	GTGTGCCACCACGTCTAGCTTTTT	7286
1758G>T>A	TTGTGCCGCCTTCGCCAACCCTCC	7490
-1000G>A	ACATCTCCCGGGCTGCCTGAGGGT	7635

12-PLEX	Sequenza UEPs	Massa
3877G>A	CCTTCCGCTTCCACCCC	4978
3183G>A	CCGCACCTGCCCTATCA	5051
2615_2617delAAG	GGCAGCCACTCTCACCT	5091
2483G>T	GCGTAGGACCTTGCCAG	5211
3853G>A	GAAGCGGAAGGGCTTCT	5275
3277T>C	TGCAGCGCTTTGGGGACA	5556
4180G>C	AGCTCATAGGGGGATGGG	5645
2939G>A	TGGGCTCACGCTGCACATC	5765
3288G>A	GATGTCATATGGGTCACAC	5828
2850C>T	AGCTTCAATGATGAGAACCTG	6454
2935A>C	AGTGCTCACGCTGCACATCCGGA	7010
1757C>T	TTGTGCCGCCTTCGCCAACCCTC	7201

Tabella 10. Sequenze e massa molecolare, espressa in Dalton, dei primers UEP inclusi nei 5 saggi multipli della piattaforma monogenica dedicata al gene *CYP2D6*, estrapolati dal software Assay Design[®] version 3.1 (Sequenom[®]).

CYP3A4	Variazione
6004G>A	G56D
13908G>A	R130Q
14269G>A	R162Q
15615T>C	F189S
15713T>C	S222P
21867C>T	T363M
21896C>T	L373F
23171T>C	M445T

CYP3A5	Variazione
3705C>T	H30Y
3709_3710 insG	Frameshift
6986A>G	Splicing defect
27289C>A	T398N
29753T>C	F446S

CYP2C9	Variazione
3608C>T	R144C
42614A>C	I359L

CYP2C19	Variazione
1A>G	GTG initiation codon
12460G>C	E92D
12748G>A	R132Q
17948G>A	W212X
19153C>T	P227L
19154G>A	Splicing defect
19294T>A	Splicing defect
12711T>C	W120R
80161A>G	I331V
90033C>T	R433W

CYP2D6	Variazione
19G>A	V7M
31G>A	V11M
77G>A	R26H
100C>T	P34S
124G>A	G42R
137_138insT	Frameshift
883G>C	Splicing defect
957C>T	A85V
974C>A	L91M
984A>G	H94R
1659G>A	V136I
1704C>G	Q151E
1707delT	Frameshift
1749A>G	N166D
1758G>T	G169X
1758G>A	G169R
1846G>A	Splicing defect
1863_1864 insTTTCGCCCC	174_175insFRP
1943G>A	R201H
2483G>T	A237S
2539_2542delAACT	Frameshift
2549delA	Frameshift
2587_2590delGACT	Frameshift
2615_2617delAAG	K281del
2850C>T	R296C
2853A>C	I297L
2935A>C	H324P
2988G>A	Splicing defect
3183G>A	V338M
3198C>G	R343G
3277T>C	I369T
3853G>A	E410K
3877G>A	E418K
4155C>T	H478Y
4180G>C	S486T

Tabella 11. Lista degli SNPs analizzati nella due piattaforme ai quali sono associate variazioni proteiche o trascrizionali (A=Alanina; R=Arginina; N=Asparagina; D=Aspartato; C=Cisteina; E=Glutammato; Q=Glutamina; G=Glicina; H=Istidina; I=Isoleucina; L=Leucina; K=Lisina; M=Metionina; F=Fenilalanina; P=Prolina; S=Serina; T=Treonina; W=Triptofano; Y=Tirosina; V=Valina; il numero riportato fra le variazioni aminoacidiche indica la posizione dell'aminoacido nella proteina).

3.4.1 Piattaforma Multigenica

Multiplex PCR primaria. Per isolare e amplificare i frammenti di DNA contenenti i polimorfismi in studio. Le reazioni di multiplex PCR sono avvenute in volume finale di 5 µl, seguendo le indicazioni della Sequenom[®] application guide (72), utilizzando:

- 10 ng DNA genomico
- 100 µM PCR Primers mix (Metabion)
- 0,5U HotStarTaq Plus DNA Polymerase (QIAGEN[®])
- 1,25X Standard PCR Buffer (QIAGEN[®])
- 1,625 mM MgCl₂ (QIAGEN[®])
- 500 µM 2'-deoxynucleoside-5'-triphosphate (dNTP) Set PCR Grade (Invitrogen[™])

Parametri di amplificazione: denaturazione iniziale a 94°C per 5 min; 45 cicli a 94°C per 20 s, 56°C per 30 s, 72°C per 1 min; estensione finale a 72°C per 3 min.

Defosforilazione SAP. I prodotti di reazione vengono purificati enzimaticamente mediante l'uso di una Fosfatasi Alcalina o SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) per rimuovere i dNTPs non incorporati nella reazione di multiplex-PCR (73). La SAP allontana un gruppo fosfato dai dNTPs non incorporati, convertendoli in 2'-deoxynucleoside-5'-diphosphate (dNDP) rendendoli così indisponibili per le reazioni successive. La reazione avviene aggiungendo al prodotto di PCR 2 µl di mix costituita da:

- 0,3U SAP Enzyme (Sequenom[®])
- 1X SAP Buffer (Sequenom[®])

Parametri: defosforilazione dNTPs a 37°C per 20 min e successiva inattivazione dell'enzima a 85°C per 5 min.

Mini-sequenziamento iPLEX. Le reazioni di SBE per la generazione di prodotti di PCR allele-specifici sono avvenute in accordo coi parametri forniti dall'iPLEX[®] Gold Reagent Kit Sequenom[®], seguendo il protocollo standard low/medium-plex (72,73). 2 µl di iPLEX reaction mix vengono aggiunti al prodotto di PCR defosforilato e sottoposto a termociclazione. Una DNA polimerasi catalizza l'aggiunta enzimatica nel sito polimorfo di uno fra i quattro mass-modified nucleotides, 2',3'-dideoxynucleoside-5'-triphosphate (ddNTP), ciascuno caratterizzato da una peso molecolare modificato (Mass-Modified Terminator). I ddNTPs, una volta incorporati, interrompono l'addizione di nuovi nucleotidi ai prodotti di estensione dei primers e aumentano la massa del prodotto di PCR di un valore che oscilla tra i 289 e i 329 Daltons. I prodotti di estensione allele-specifici così generati, sono ciascuno distinto da un'unica e peculiare massa molecolare in grado di essere rilevata, senza ambiguità, dallo spettrofotometro di massa. L'iPLEX reaction mix è costituito da:

- 1X iPLEX Buffer Plus (Sequenom[®])
- 1X iPLEX Termination Mix (Sequenom[®]), contenente i 4 ddNTPs ad uguale concentrazione
- 1X iPLEX Enzyme (Sequenom[®])
- UEPs (Metabion), suddivisi in quattro gruppi, in accordo con le posizioni dei rispettivi picchi nell'intero spettro, con concentrazione finale compresa fra 0,6 e 1,5 µM

I parametri di mini-sequenziamento sono i seguenti:

- denaturazione iniziale a 94°C per 30 s
 - denaturazione a 94°C per 5 s
 - annealing a 52°C per 5 s
 - estensione a 80°C per 5 s
 - estensione finale a 72°C per 3 min
- $\left. \begin{array}{l} \text{denaturazione a 94°C per 5 s} \\ \text{annealing a 52°C per 5 s} \\ \text{estensione a 80°C per 5 s} \end{array} \right\} 5 \text{ cicli} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{denaturazione a 94°C per 5 s} \\ \text{annealing a 52°C per 5 s} \\ \text{estensione a 80°C per 5 s} \end{array}} \right\} 40 \text{ cicli}$

3.4.2 Piattaforma Monogenica

La caratterizzazione molecolare del gene *CYP2D6* è piuttosto complessa a causa dell'elevato numero di polimorfismi da studiare, alcuni dei quali condivisi da aplotipi diversi, ed inoltre per l'elevata omologia tra il *CYP2D6* e dei due suoi pseudogeni adiacenti *CYP2D7P* e *CYP2D8P*. Per questo motivo è stato necessario apportare alcune modifiche al protocollo standard di amplificazione. Al fine di ridurre il numero dei primers di PCR ed evitare la falsa genotipizzazione a causa di una non specifica co-amplificazione fra il *CYP2D6* ed i suoi pseudogeni, è stata messo a punto un protocollo di Long range PCR che va sostituire lo Multiplex PCR primaria standard.

Long Range PCR primaria. La reazione di amplificazione è avvenuta in volume finale di 5 µl, apportando variazioni al protocollo standard QIAGEN® LongRange PCR (74):

- 20 ng DNA genomico
- 400 µM di ogni PCR Primer (Metabion)
- 0,2U LongRange PCR Enzyme Mix (QIAGEN®)
- 1X LongRange PCR Buffer (QIAGEN®)
- 500 µM dNTP Set PCR Grade (Invitrogen™)

Parametri di amplificazione: denaturazione iniziale a 93°C per 3 min; 35 cicli a 93°C per 30 s, 61°C per 30 s, 68°C per 6 min.

Il primer Forward (Pprom 5'-GGTCCTCCTGTCCTCAGTGGAT-3') è stato disegnato in una regione altamente non omologa fra *CYP2D6* e *CYP2D7P*, la 5'untranslated region (UTR), nucleotidi 2403-2424, in accordo con la sequenza AY545216 (75). Il primer reverse utilizzato è 2D6-R (5'-ACTGAGCCCTGGGAGGTAGGTA-3'), già descritto (76). Come suggerito dal protocollo Sequenom®, una coda in 5' di 10 bp (5'-ACGTTGGATG-3') è stata aggiunta ad entrambi i primers di

PCR, al fine di aumentarne l'efficienza durante la reazione di amplificazione. Il prodotto di amplificazione ha una lunghezza 6.572 bp.

Defosforilazione SAP. Non è stata apportata nessuna modifica rispetto al protocollo precedentemente descritto.

Mini-sequenziamento iPLEX. A causa della lunghezza del prodotto primario di PCR ed all'elevato contenuto in GC, le reazioni SBE sono avvenute apportando modificazione anche ai parametri forniti dall'iPLEX[®] Gold Reagent Kit Sequenom[®] (72,73). L'iPLEX reaction mix è costituito da:

- 1X iPLEX Buffer Plus (Sequenom[®])
- 1X iPLEX Termination Mix (Sequenom[®]), contenente i 4 ddNTPs ad uguale concentrazione
- 1X iPLEX Enzyme (Sequenom[®])
- UEPs (Metabion), suddivisi in quattro gruppi, in accordo con le posizioni dei rispettivi picchi nell'intero spettro, con concentrazione finale compresa fra 0,8 e 2,0 μ M

I parametri di mini-sequenziamento sono i seguenti:

- denaturazione iniziale a 94°C per 30 s
- | | | |
|--------------------------------------|-----------|------------|
| • denaturazione a 94°C per 30 s | } 5 cicli | } 40 cicli |
| • annealing a 56°C per 5 s | | |
| • estensione a 80°C per 5 s | | |
| • estensione finale a 72°C per 3 min | | |

3.4.3 Purificazione

In entrambe le piattaforme i prodotti di mini-sequenziamento sono stati sottoposti a purificazione con Clean Resin[®] (Sequenom[®]) per l'eliminazione di sali o eventuali altri contaminanti che potrebbero interferire con l'analisi allo Spettrofotometro di Massa. A questo scopo ogni campione viene diluito in 16 µl di acqua a cui sono addizionati 6 mg di Sequenom Clean Resin[®] e centrifugato a 4000 rpm, 25°C per 30 min

3.4.4 Misurazione MALDI-TOF MS

Una microaliquota (15/20 nl) di ogni prodotto di reazione iPLEX viene trasferita su un 384-spot SpectroChip (Sequenom[®]) (Figura 8). Lo SpectroChip è una componente integrante del sistema MassARRAY[®] ed è costituito da un chip in silicone diossido, fotoresistente, in formato da 384 pozzetti (può quindi contenere e analizzare fino a 384 campioni) “pre-spottati” con una particolare matrice MALDI.

L'analisi dello SpectroChip avviene con lo spettrometro di massa MassARRAY[®]. Questo strumento fornisce un modo veloce e accurato per ottenere la genotipizzazione di un elevato numero di SNPs in tempo reale. Il principio su cui si basa lo spettrometro di massa MassARRAY[®] è dato dalla possibilità di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica (m/z) mediante l'applicazione di campi magnetici. Una volta inserito nel MALDI-TOF, lo SpectroChip viene irradiato da un fascio laser che volatilizza il prodotto di PCR. Il fascio laser è impiegato per ionizzare le molecole dei campioni da analizzare che diventano instabili e si frammentano in ioni più leggeri secondo schemi tipici, in funzione della loro struttura chimica. Il flusso di ioni prodotto entra nell'analizzatore TOF, un dispositivo costituito da una colonna ad alto vuoto, capace di separare gli ioni in funzione del loro rapporto m/z , misurando il “tempo di volo” (TOF) impiegato da ciascuno ione per percorrere l'intero spazio dell'analizzatore e giungere al rivelatore. Per ogni SNP, il peso molecolare di ciascun allele, può

essere determinato in base alla velocità relativa o TOF relativo. Il TOF sarà proporzionale alla massa e quindi alla composizione nucleotidica del frammento di DNA (77).

Alla fine dell'esame, il software Typer[®] MassARRAY RT[™] version 3.3 (Sequenom[®]) (Figura 9), converte in tempo reale (1/3 secondi) i valori misurati (TOF e massa) per ciascun campione in genotipo, rilevando così l'eventuale presenza del polimorfismo in condizioni di omo- o eterozigosi (Figura 9). Questo programma è in grado di identificare ogni ione in funzione della sua massa in modo tale da ottenere uno spettro di massa finale. Lo spettro di massa mostra nell'asse delle ordinate l'intensità relativa dei picchi e nell'asse delle ascisse la massa degli alleli espressa in Dalton. Un esempio di uno spettro multi-plex è mostrato in Figura 11.

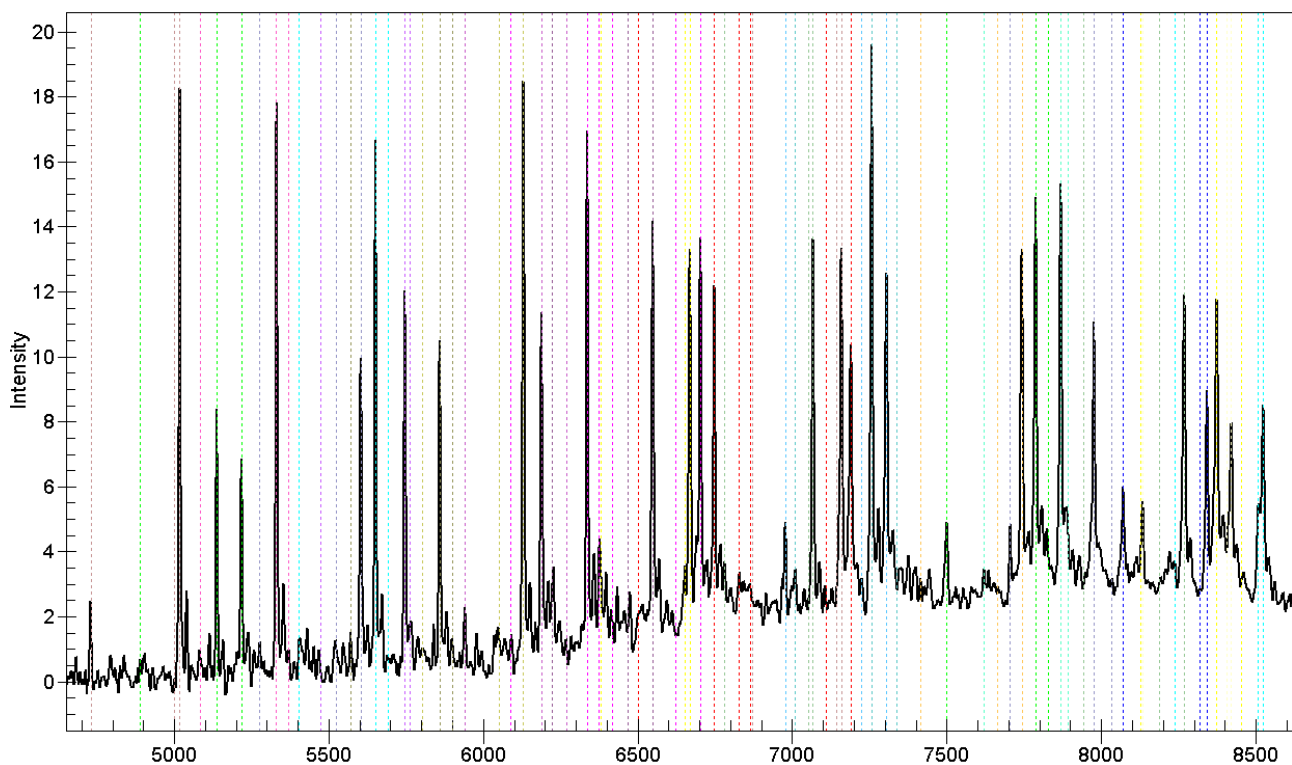


Figura 11. Esempio dello spettro di massa MALDI-TOF 21-plex della Piattaforma Multigenica. L'elaborazione dei dati produce uno spettro con l'intensità relativa nell'asse delle ordinate e la massa, espressa in Dalton, nell'asse delle ascisse. L'analisi dello spettro fornisce il tipo di mutazione presente, indicandola come omozigote wild type, omozigote mutato o eterozigote.

La presenza delle varianti alleliche selezionate è stata quindi determinata su un gruppo di 250 individui sani di origine Sarda, per verificare l'attendibilità e la ripetibilità di queste piattaforme di screening. Un esempio di cluster di distribuzione e alcuni esempi di spettro di massa per lo SNP *CYP2D6* 1661G>C, sono mostrati nelle Figure 12-15.

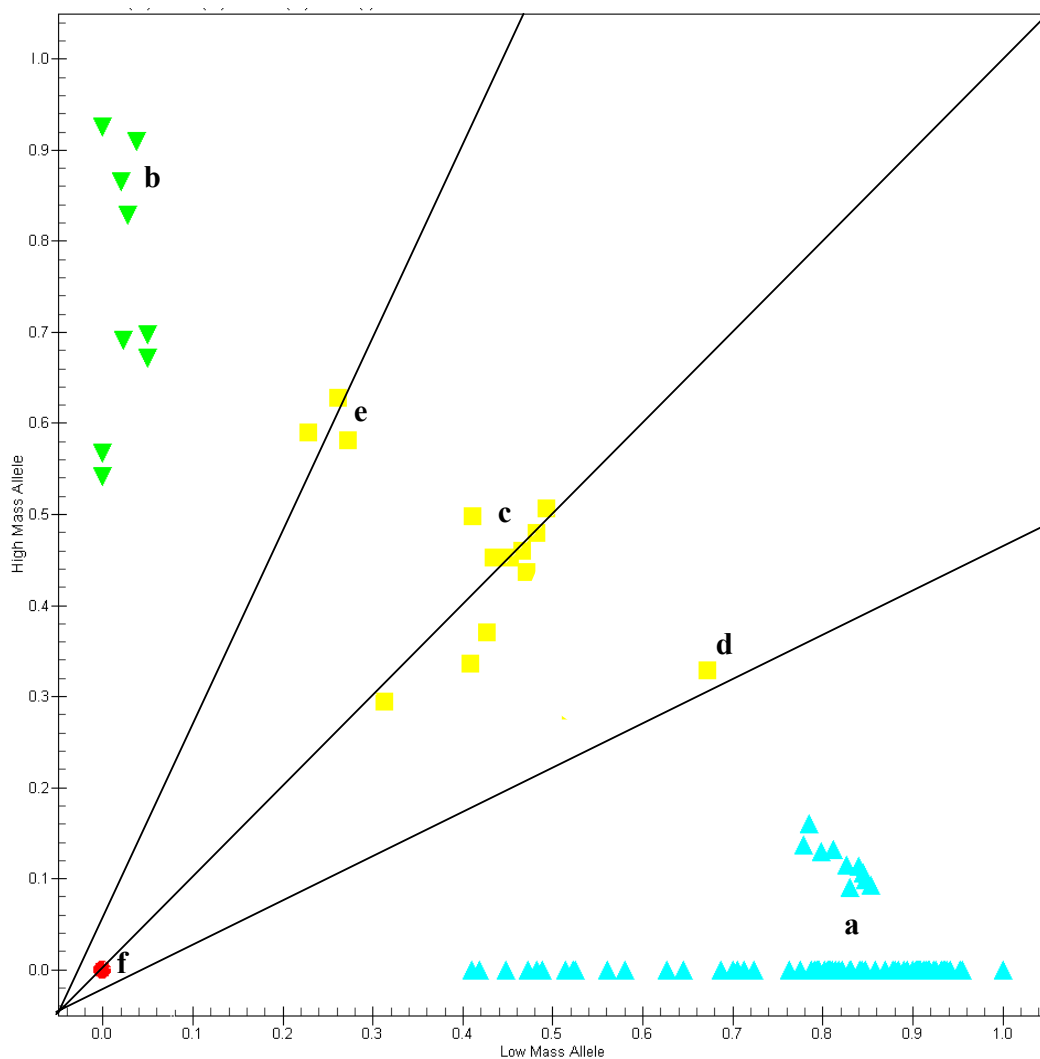


Figura 12. Esempio di cluster di distribuzione per lo SNP *CYP2D6* 1661G>C. **a:** campioni omozigoti wild type G/G; **b:** campioni omozigoti mutati C/C; **c:** campioni eterozigoti G/C; **d, e:** campioni outlier eterozigoti G/C risultanti in duplicazione di numero di copie geniche; **f:** controllo negativo (H₂O mQ).

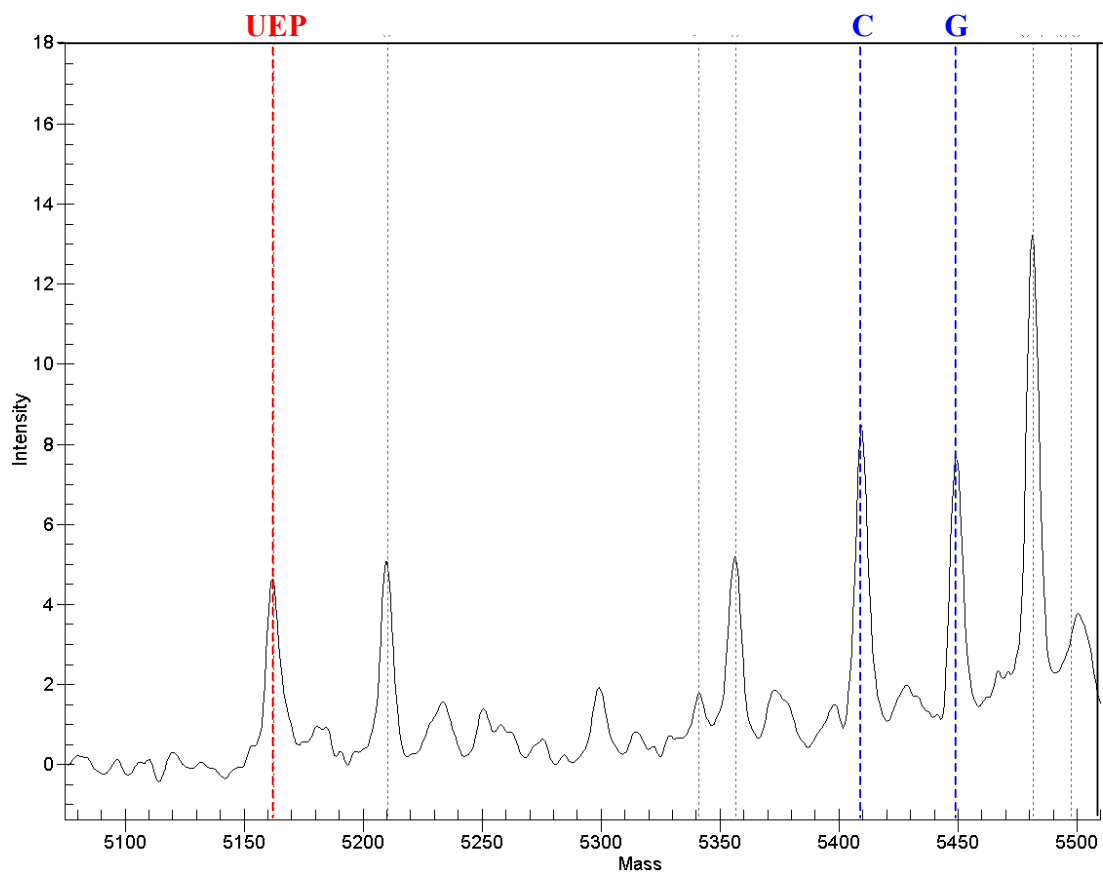


Figura 13. Esempio di spettro di massa di un campione eterozigote per lo SNP *CYP2D6* 1661G/C (Fig.12c).

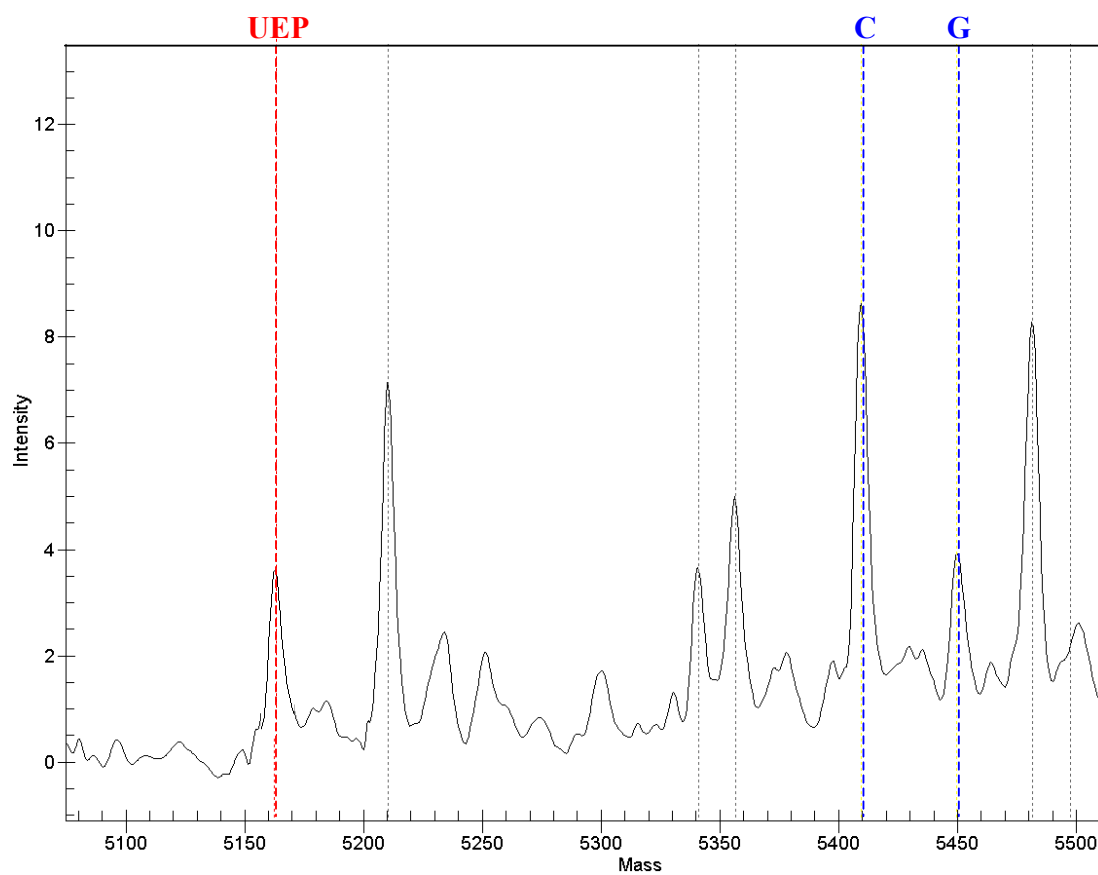


Figura 14. Esempio di spettro di massa di un campione eterozigote outlier per lo SNP *CYP2D6* 1661G/C (Fig.12e), risultante come allele *CYP2D6**2xN.

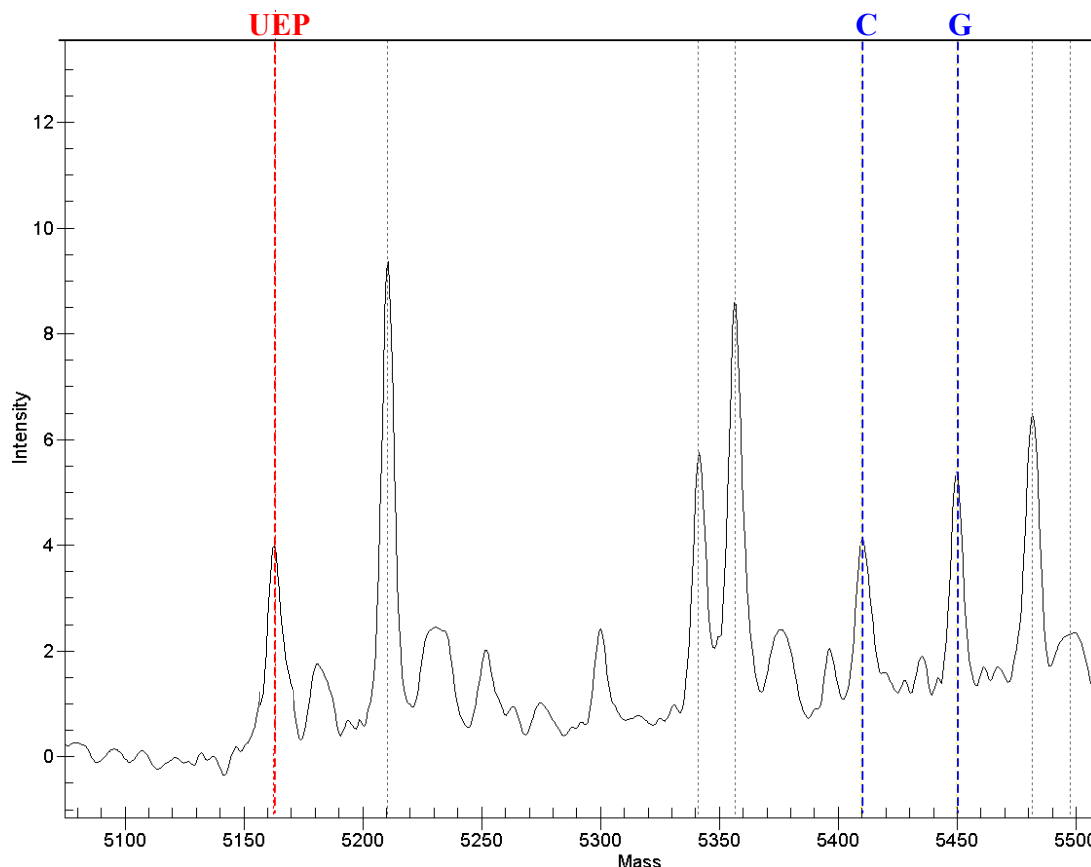


Figura 15. Esempio di spettro di massa del campione eterozigote outlier per lo SNP *CYP2D6* 1661G/C (Fig.12d), risultante come allele *CYP2D6*1xN*.

Le reazioni di Multiplex PCR primaria, di Long Range PCR, di defosforilazione SAP e di mini-sequenziamento iPLEX sono state effettuate su micropiastre Thermo-Fast 384 Well (Abgene®) e su termociclatore DNA Engine Tetrad2® Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad).

Tutti i passaggi di pipettamento automatico sono stati effettuati con l'utilizzo della stazione automatica Matrix PlateMate™ 2x2 (Sequenom®).

Il trasferimento da micropiastre Thermo-Fast 384 Well (Abgene®) a 384-spot SpectroChip (Sequenom®) è avvenuto tramite la stazione automatica MassArray™ Nanodispenser (Samsung).

3.5 Allelic Discrimination

La metodica “Allelic Discrimination by 5’ Nucleare Assay”, è una metodica semplice, rapida e altamente specifica, che implica l’ibridazione di nucleotidi allele-specifici e la determinazione attraverso il trasferimento di energia di risonanza fluorescente (FRET), di un singolo SNP in un numero

elevato di campioni (fino a 384). Tale strategia utilizza la sonda TaqMan[®] Drug Metabolism Genotyping (DME) (Applied Biosystems[™]) (78), un oligonucleotide che, come i primers utilizzati nella metodica della PCR, è complementare alla sequenza bersaglio da amplificare nella regione circoscritta alla localizzazione del polimorfismo, ed è in grado di appaiarsi tra i due primers forward e reverse. Il potere di discriminazione allelica del metodo, è dato dall'uso di due sonde, ciascuna specifica per le varianti alleliche possibili, e ciascuna marcata con un differente fluoroforo Reporter, il colorante fluorescente FAM ed il colorante fluorescente VIC; ciò permette che entrambi gli alleli dello stesso SNP siano analizzati in una singola reazione. Un sostanziale aumento del segnale di fluorescenza del FAM o del VIC indica omozigosi per l'allele FAM o VIC specifico, mentre un aumento di entrambi i segnali fluorescenti indica una condizione di eterozigoti di un determinato SNP nel campione di interesse (Figure 16 e 17).

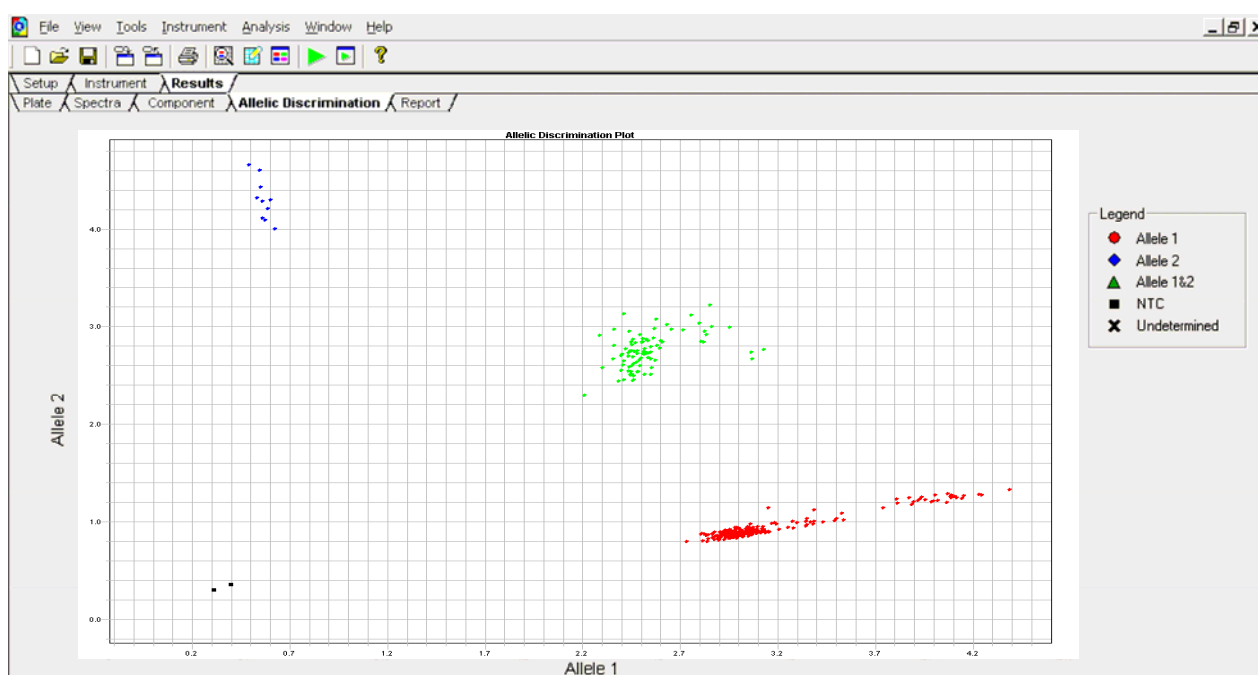


Figura 16. Rappresentazione grafica del rilevamento di fluorescenza effettuato con un software direttamente collegato allo strumento di analisi, Taqman 7900HT (Applied Biosystem[™]). In rosso sono indicati i campioni omozigoti per l'allele 1, in blu gli omozigoti per l'allele 2, in verde i campioni eterozigoti.

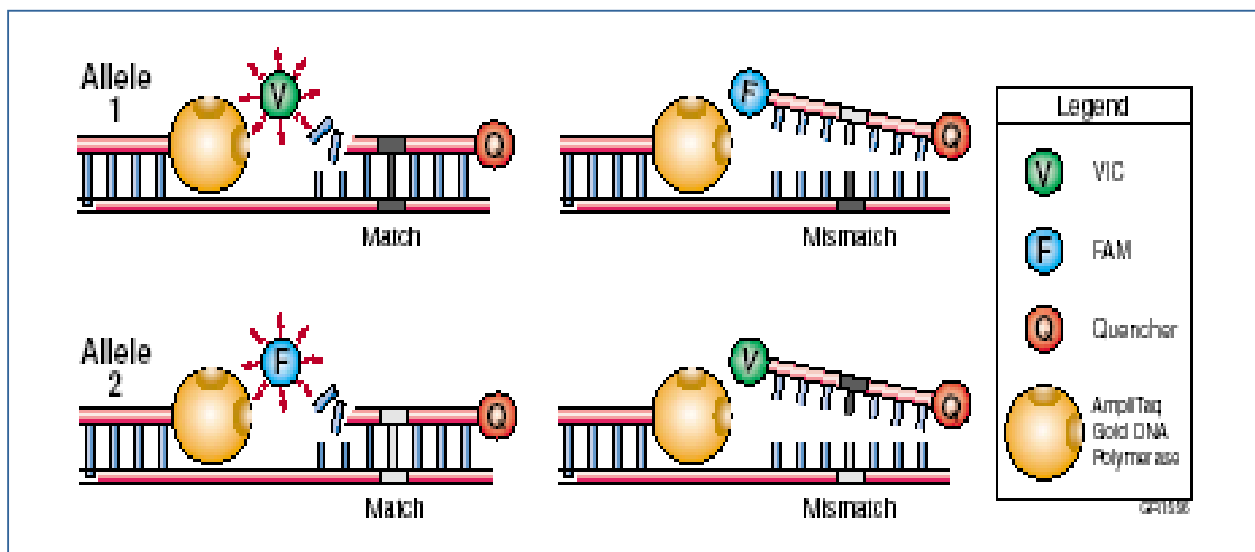


Figura 17. Rappresentazione grafica dei possibili risultati in un esempio di saggio di discriminazione allelica: un sostanziale incremento della sola fluorescenza VIC indica omozigosi per l'allele 1; della sola fluorescenza FAM indica omozigosi per l'allele 2; presenza di entrambi i segnali fluorescenti, indica eterozigotità.

La metodica della discriminazione allelica è stata utilizzata per la validazione di 8 SNPs: il polimorfismo *CYP2C9* 3608C>T (sonda DME n° C2562580510), e sette fra i polimorfismi del *CYP2D6*, ovvero gli SNPs -1584C>G (sonda DME n° hCV32407252), -740C>T (hCV27102448), 100C>T (hCV11484460), 1846G>A (hCV27102431), 2850C>T (hCV27102425), 2988G>A (hCV34816116) e 4180G>C (hCV27102414). Queste mutazioni sono state analizzate in tutti i 384 campioni Sardi. Le reazioni sono state eseguite in un volume finale di 5 µl contenenti:

- 2 ng DNA genomico
- 1X Universal PCR Master Mix (contenente AmpliTaq Gold DNA polymerase) (TaqMan[®])
- 1X DME Assay Mix (TaqMan[®])

I saggi di discriminazione allelica sono stati eseguiti su micropiastre MicroAmp[®] Optical 384 Well (Applied BiosystemsTM) utilizzando il sistema ABIPRISM 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied BiosystemsTM) (Figura 18). Parametri di amplificazione: denaturazione iniziale a 95°C per 10 min; 50 cicli a 92°C per 15 s, 60°C per 90 s.



Figura 18. Sistema ABIPRISM 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems™).

3.6 Analisi PCR-RFLP

La presenza del polimorfismo *CYP2C19* –3402C>T è stato validato in tutti i 250 campioni Sardi mediante analisi PCR seguita da analisi RFLP (restriction fragment length polymorphism). Una reazione di amplificazione di 500 bp è stata eseguita in un volume finale di 20 µl contenenti:

- 40 ng DNA genomico
- 0,5U HotStarTaq Plus DNA Polymerase (QIAGEN®)
- 1X Standard PCR Buffer (QIAGEN®)
- 1,5 mM MgCl₂ (QIAGEN®)
- 200 µM dNTP Set PCR Grade (Invitrogen™)
- 400 nM di ciascun primer (Metabion)

Sono stati utilizzati i primers 2C19F 5'-AATAAAGATGACCTTGATCTGG-3' (forward) e 2C19R 5'-GTCTCCTGAAGTGTCTGTAC-3' (reverse) (79). Parametri di amplificazione: denaturazione iniziale a 94°C per 1 min; 35 cicli a 94°C per 30 s, 52°C per 30 s, 72°C per 30 s; estensione finale a 72°C per 5 min. 5 µl di ciascun prodotto di PCR sono stati sottoposti a reazione RFLP usando l'enzima di restrizione *Mnl I* (New England BioLabs®). I prodotti di PCR ed i prodotti digeriti sono quindi stati

analizzati elettroforeticamente su gel di Agarosio all'1,5% (Invitrogen™) in tampone TBE 1X (Invitrogen™), colorato con SYBR® Gold nucleic acid gel stain (Invitrogen™) 1X. In ogni pozzetto è stato caricato 1 µl di prodotto con 1 µl di tampone di carico BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen™) e acqua distillata, per un volume finale di 10 µl. I prodotti di PCR e PCR-RFLP, a migrazione avvenuta, sono stati visualizzati tramite il transilluminatore Fujifilm Las-1000 analyzer (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH) come una banda fluorescente. La presenza del wild-type -3402C è stata indicata dalla presenza di due frammenti di 280 bp e 224 bp, mentre la mutazione -3402T è stata confermata dalla resistenza enzimatica alla digestione (Figura 19).

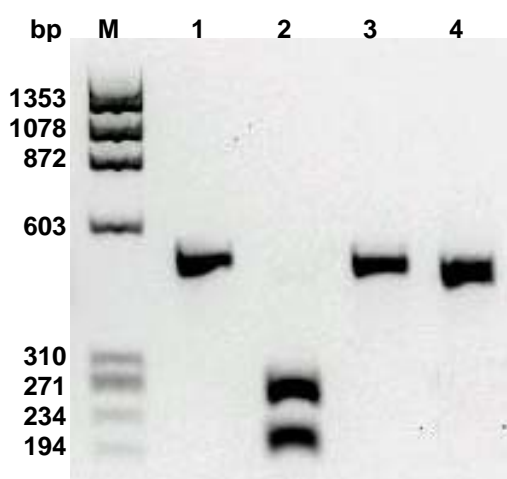


Figura 19. Elettroforesi di prodotti di PCR e PCR-RFLP su gel di Agarosio all'1,5%. Colonne: M=Molecular weight marker ΦX174 RF DNA/*Hae* III Fragments (Invitrogen™); 1=prodotto di PCR del campione wild type A *CYP2C19* -3402C/C; 2=prodotto di PCR-RFLP del campione wild type A *CYP2C19* -3402C/C; 3=prodotto di PCR del campione omozigote mutato B *CYP2C19* -3402T/T; 4=prodotto di PCR-RFLP del campione omozigote mutato B *CYP2C19* -3402T/T.

3.7 Copy Number Variation (CNV)

In alcuni campioni analizzati con la piattaforma monogenica per lo screening dei polimorfismi del *CYP2D6*, è stata osservata una condizione di eterozigotità con notevole sbilanciamento dei due alleli (Figure 14 e 15). Questi campioni si presentano come outlier nel cluster di distribuzione dei genotipi (Figura 12) e, per questo motivo, spesso i genotipi non vengono riconosciuti dal software di

analisi e definiti come eterozigoti “low probability”. Poiché gli assay mostrano una buona clusterizzazione dei risultati, per questi campioni si è ipotizzata la presenza di un allele duplicato.

Per verificare la presenza sia di duplicazioni che di delezioni geniche (allele *CYP2D6**5), è stata utilizzata la sonda TaqMan® Gene Copy Number (Applied Biosystems™) (80). Come per i saggi di discriminazione allelica, la sonda è costituita da un oligonucleotide complementare alla sequenza bersaglio da amplificare in grado di appaiarsi tra i due primers forward e reverse. Vengono coamplificata in Real Time (RT), direttamente su DNA genomico, una porzione di circa 250 bp del gene nel quale si vuole verificare la presenza di variazioni del numero di copie ed una porzione, sempre di circa 250 bp, del gene umano di controllo *RNase P*, altamente conservato e che non presenta variazioni di numero di copia. L’uso di due sonde, ciascuna marcata con un differente fluoroforo Reporter, il colorante fluorescente FAM per il gene da analizzare (sonda CNV n° Hs00010001_cn), ed il colorante fluorescente VIC per il gene di controllo *RNase P*, permette che entrambe le amplificazioni siano effettuate in un singolo pozzetto. Un aumento proporzionale del segnale di fluorescenza del FAM rispetto al VIC, indica la presenza o meno di una variazione del numero di copie di gene *CYP2D6* rispetto al numero di copie del gene *RNase P* (Figura 20).

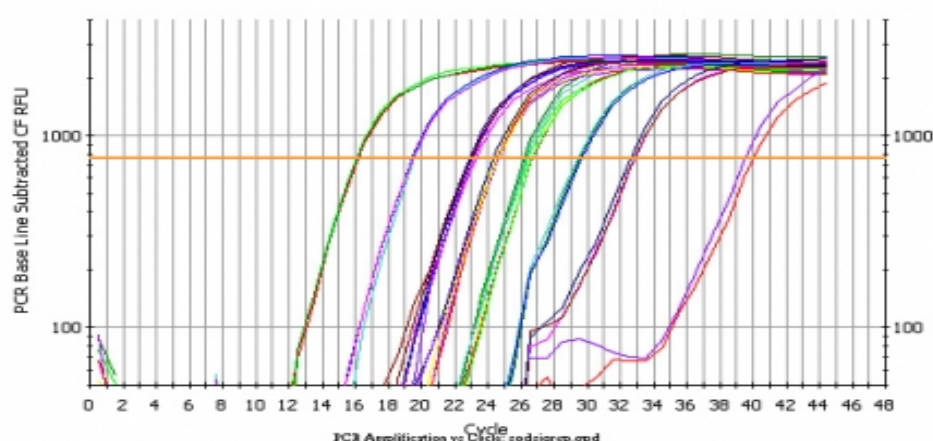


Figura 20. Esempio di coamplificazione in Real Time su DNA genomico del gene *CYP2D6* e del gene di controllo *RNase P*.

L'analisi è stata effettuata su tutti i 250 campioni Sardi. Le reazioni sono state eseguite in un volume finale di 10 µl contenenti:

- 10 ng DNA genomico
- 2X Universal PCR Master Mix (TaqMan[®])
- 1X VIC-*RNase P* Assay (TaqMan[®])
- 1X FAM-labeled *CYP2D6* gene specific assay Hs00010001_cn (TaqMan[®])

I saggi di CNV sono stati eseguiti su micropiastre MicroAmp[®] Optical 384 Well (Applied BiosystemsTM) utilizzando il sistema ABIPRISM 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied BiosystemsTM) (Figura 18). Parametri di amplificazione: denaturazione iniziale a 95°C per 10 min; 40 cicli a 95°C per 15 s, 60°C per 60 s. La presenza di duplicazioni e/o delezioni è stata calcolata utilizzando il programma di analisi impostato su foglio excel, fornito insieme alla sonda.

3.8 Determinazione degli aplotipi

La tecnologia MALDI-TOF utilizzata per ricavare i dati genotipici dai campioni in studio, non fornisce informazioni circa la fase degli SNPs sul cromosoma. Se c'è infatti un limite, nell'analisi mediante questa tecnica, è il fatto che essa fornisce il set delle mutazioni caratteristiche per ogni campione analizzato, ma non viene effettuata l'associazione tra questo insieme di mutazioni e il nome dell'allele corrispondente. Pertanto, al fine di evitare ulteriori complesse e costose tecniche di laboratorio che prevedono il clonaggio dei cromosomi in stato aploide o il genotyping addizionale dei familiari degli individui oggetto di studio, è possibile ricorrere all'uso di metodi statistici che permettono di inferire la fase stessa a partire dal dato dei singoli SNPs (81). A questo scopo è stato utilizzato un algoritmo di ricostruzione degli aplotipi che permette di stimare le frequenze aplotipiche, dai dati genotipici osservati, attraverso un criterio di Maximum-Likelihood, basandosi sull'algoritmo Expectation-Maximization (EM) (82). Si tratta di una procedura iterativa il cui scopo è quello di stimare

le frequenze aplotipiche che massimizzano la probabilità di ottenere i dati osservati; tali stime sono note come “stime della massima verosimiglianza”. L'algoritmo EM implica l'assunzione di equilibrio di Hardy-Weinberg e il principio su cui si basa prevede:

- 1) una stima iniziale random delle frequenze aplotipiche per ogni dato genotipico a fase ignota osservato;
- 2) l'utilizzo di questi valori iniziali per calcolare, durante il primo ciclo di iterazione, le nuove frequenze genotipiche attese (step-E);
- 3) le frequenze genotipiche relative, ottenute nello step-E, vengono utilizzate come “pesi” per una nuova stima delle frequenze aplotipiche (step-M);
- 4) i cicli 2) e 3) vengono ripetuti finché l'algoritmo non giunge a convergenza.

Mediante il metodo delle “sliding windows” il software analizza il primo segmento (window) contenente un numero specificato di polimorfismi e restituisce tutti i possibili aplotipi all'interno di quel segmento; la finestra successivamente si sposta di una posizione e il software inferisce la fase degli SNPs appartenenti al segmento seguente e così via. La velocità di esecuzione del programma dipende esponenzialmente dalla dimensione della “sliding window” specificata nell'analisi. Il programma fornisce un output con una lista di tutti i possibili aplotipi, per ogni “window” o blocco specificati, con le relative frequenze secondo la “migliore ricostruzione”.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Nell'ambito di questo studio è stato possibile analizzare 111 fra i più importanti polimorfismi Caucasiche presenti in 5 geni appartenenti alla famiglia del CYP450, e precisamente 12 SNPs del gene *CYP3A4*, 8 SNPs del gene *CYP3A5*, 11 SNPs del gene *CYP2C9*, 14 SNPs del gene *CYP2C19* e 66 SNPs del gene *CYP2D6*. La presenza di questi SNPs ha permesso la ricostruzione non solo degli aplotipi più comuni della popolazione Caucasica ma, nello specifico per il gene *CYP2D6*, è stato possibile studiare e verificare la presenza anche di alcuni aplotipi Afroamericani ed Asiatici all'interno dei campioni Sardi analizzati. In totale è stato possibile verificare la presenza di 9 varianti e 5 sottovarianti aplotipiche del gene *CYP3A4*, 3 varianti e 5 sottovarianti aplotipiche del gene *CYP3A5*, 3 varianti e 6 sottovarianti aplotipiche del gene *CYP2C9*, 10 varianti e 3 sottovarianti aplotipiche del gene *CYP2C19*, 40 varianti e 22 sottovarianti aplotipiche del gene *CYP2D6*.

L'estrapolazione degli aplotipi è stata eseguita basandosi sull'algoritmo Expectation-Maximization (EM) (82) che permette di stimare le frequenze aplotipiche dai dati genotipici osservati, attraverso il criterio di Maximum-Likelihood e prendendo come riferimento gli aplotipi più comuni descritti nella popolazione Caucasica e disponibili nel database di pubblico accesso "The Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee" (8).

4.1 Piattaforma multigenica

Lo screening dei polimorfismi del gene codificante per l'isoenzima CYP3A4 ha confermato la rarità delle varianti associate a fenotipi PM nei campioni Sardi analizzati, in accordo con le frequenze della popolazione Caucasica (83,84) (Tabella 12), infatti quasi il 100% delle varianti polimorfe individuate nella casistica analizzata, non altera la funzionalità dell'enzima wild-type (Tabella 13).

È stata riscontrata la presenza del polimorfismo 13908G>A, responsabile della mutazione aminoacidica

Arginina→Glutamina (R130Q) nell'allele *CYP3A4**8, presente nei campioni Sardi analizzati con una frequenza pari allo 0,3%, risultato in accordo con le frequenze della popolazione Caucasica (83,84). L'allele *CYP3A4**8, responsabile di un fenotipo PM, riduce in modo significativo i livelli di questo enzima, ma è stato trovato sempre in combinazione con l'allele wild-type *CYP3A4**1A, (0,5% dei campioni) (Tabella 13) con fenotipo atteso IM.

La rarità di varianti differenti dal fenotipo EM si ritiene da imputare all'importante ruolo che l'enzima *CYP3A4* svolge nel metabolismo di numerosi composti endogeni.

Il gene *CYP3A5* è altamente polimorfo ed alcune varianti alleliche non funzionali, piuttosto comuni nella popolazione Caucasica, sono generate da difetti di splicing che riducono notevolmente i livelli di proteina funzionale.

Nell'ambito di questo studio è stata osservata la presenza dominante del polimorfismo 6986A>G, responsabile, appunto, di un difetto di splicing e caratterizzante l'allele *CYP3A5**3 (PM) che, considerando l'insieme dei suoi sotto-alleli *CYP3A5**3A, 3B e 3E, è stato osservato nell'89,2% dei campioni analizzati (Tabella 12), dato questo altamente discordante da ciò che è stato sinora osservato nella popolazione Caucasica di riferimento (84-86).

In nessun campione è stata invece riscontrata la presenza dello SNP 27289C>A, caratterizzante l'allele *CYP3A5**2 (EM), risultato anche questo non in linea con le frequenze finora osservate nella popolazione Caucasica (2,0%) (85,86).

Si evidenzia la presenza del 20,3% di individui con genotipo *CYP3A5**1/*3, fenotipo atteso IM, del ben 78,4% di individui con genotipo *CYP3A5**3/*3, fenotipo atteso PM, e solo dell'1,3% di individui con genotipo *CYP3A5**1/*1, fenotipo atteso EM (Tabella 13), dati da tenere in considerazione in caso di somministrazione di farmaci che vengono metabolizzati da questo enzima.

L'analisi dei polimorfismi del gene *CYP2C9*, ha dimostrato la presenza nel campione della popolazione Sarda analizzata, delle due più importanti varianti alleliche descritte in letteratura (Tabella 12) (83). Si tratta dell'allele *CYP2C9**2, caratterizzato, in modo particolare, dallo SNP 3608C>T, responsabile della mutazione aminoacidica Arginina→Cisteina (R144C) e dell'allele *CYP2C9**3, associato, fra gli altri, allo SNP 42614A>C, che determina la variante aminoacidica Isoleucina→Leucina (I359L). In entrambi i casi gli alleli mutati determinano una riduzione dell'attività enzimatica e si presentano con una frequenza simile rispetto a quella finora descritta nella popolazione Caucasica (84,87,88), rispettivamente del 14,8% del 5,0%.

Inoltre la presenza del polimorfismo 3608C>T è stata confermata su tutti i 250 campioni, con la metodologia della discriminazione allelica, utilizzando la sonda TaqMan[®] DME (Applied BiosystemsTM). La concordanza dei risultati è stata del 100%.

Anche le frequenze genotipiche (Tabella 13) risultano essere in linea con le frequenze Caucasiche descritte (87,88), presentando solo il 4,4% di individui con fenotipo atteso PM (*CYP2C9**2/*2, *2/*3, *3*3).

Per quanto riguarda i polimorfismi del gene *CYP2C19*, descritti per la loro influenza, insieme al *CYP2D6*, sul metabolismo di molte classi di antidepressivi, sono stati individuati nella popolazione Sarda con frequenze dissimili rispetto a quelle descritte per la popolazione Caucasica (Tabella 12) (83,84,87).

Due alleli in particolare, presentano frequenze notevolmente differenti: l'allele *CYP2C19**2 caratterizzato dagli SNPs 19154G>A, responsabile di un difetto di splicing, e 80161A>G che invece determina la variante aminoacidica Isoleucina→Valina (I331V) (fenotipo atteso PM), è stato osservato con una frequenza pari al 36,6% contro il 21,0% della Caucasica; l'allele *CYP2C9**17, associato sempre allo SNP 80161A>G (fenotipo atteso UM), con una frequenza pari al 16,6% contro il 25,0%

della Caucasica (Tabella 13).

Inoltre la presenza del polimorfismo -3402C>T, indicativo sempre dell'allele *CYP2C9**17, è stata confermata su tutti i 250 campioni, con la metodica della PCR-RFLP. La concordanza dei risultati è stata del 100 %.

L'allele *CYP2C19**4, caratterizzato dallo SNP 1A>G, responsabile di una inibizione della trascrizione, fenotipo atteso PM, è stato trovato nello 0,8% dei campioni, in linea con le frequenze Caucasiche.

Gli alleli *CYP2C19**3, *5, *6, *7, *8 e *10, rari nella popolazione Caucasica (frequenza < 0,5%), non sono invece mai stati trovati nei campioni Sardi analizzati.

Nonostante queste differenze nelle frequenze alleliche, le frequenze dei fenotipi attesi non si discostano molto dalle frequenze precedentemente descritte (87), presentando il 14,6% di individui probabili PM, il 33,9% di probabili IM, ed il 2,9% di probabili UM (Tabella 14).

Le frequenze genotipiche per tutti i quattro citocromi analizzati nella piattaforma multigenica sono sempre risultate essere in equilibrio con l'equazione di Hardy-Weinberg (X^2 test P value > 0,05) (Tabella 13).

Gene	Allele	Numero di Cromosomi	Frequenza (%)	Attività Enzimatica Associata
<i>CYP3A4</i>	<i>*1A</i>	481	96,2	EM
	<i>*1B</i>	-	-	EM
	<i>*1C</i>	-	-	EM
	<i>*1D</i>	2	0,4	EM
	<i>*1F</i>	15	3,1	EM
	<i>*2</i>	-	-	EM
	<i>*3</i>	-	-	EM
	<i>*7</i>	-	-	EM
	<i>*8</i>	2	0,3	PM
	<i>*11</i>	-	-	PM
	<i>*12</i>	-	-	PM
	<i>*15A</i>	-	-	EM
	<i>*15B</i>	-	-	EM
	<i>*17</i>	-	-	PM

Gene	Allele	Numero di Cromosomi	Frequenza (%)	Attività Enzimatica Associata
<i>CYP3A5</i>	<i>*1A</i>	45	9,0	EM
	<i>*1C</i>	9	1,8	EM
	<i>*1D</i>	-	-	EM
	<i>*2</i>	-	-	EM
	<i>*3A</i>	413	82,6	PM
	<i>*3B</i>	11	2,2	PM
	<i>*3E</i>	22	4,4	PM
	<i>*3K</i>	-	-	PM

Gene	Allele	Numero di Cromosomi	Frequenza (%)	Attività Enzimatica Associata
<i>CYP2C9</i>	<i>*1A</i>	347	69,4	EM
	<i>*1B</i>	45	9,0	EM
	<i>*1C</i>	5	1,0	EM
	<i>*1D</i>	4	0,8	EM
	<i>*2A</i>	60	12,0	PM
	<i>*2B</i>	14	2,8	PM
	<i>*2C</i>	-	-	PM
	<i>*3A</i>	6	1,2	PM
	<i>*3B</i>	19	3,8	PM

Gene	Allele	Numero di Cromosomi	Frequenza (%)	Attività Enzimatica Associata
<i>CYP2C19</i>	<i>*1A</i>	198	39,6	EM
	<i>*1C</i>	32	6,4	EM
	<i>*2A</i>	162	32,4	PM
	<i>*2B</i>	21	4,2	PM
	<i>*3</i>	-	-	PM
	<i>*4</i>	4	0,8	PM
	<i>*5A</i>	-	-	PM
	<i>*5B</i>	-	-	PM
	<i>*6</i>	-	-	PM
	<i>*7</i>	-	-	PM
	<i>*8</i>	-	-	PM
	<i>*10</i>	-	-	PM
	<i>*17</i>	83	16,6	UM

Tabella 12. Frequenze alleliche dei citocromi *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9* e *CYP2C19*, estrapolate dall'analisi genetica effettuata su 250 campioni di DNA estratti da individui sani di origine Sarda ed attività enzimatica associata agli alleli. Numero totale di Cromosomi = 500.

Gene	Genotipo	Frequenza Osservata (%)	Frequenza Attesa (%)	Attività Enzimatica Attesa
<i>CYP3A4</i>	<i>*1A/*1A</i>	92,4	92,6	EM
	<i>*1A/*1D</i>	0,8	0,8	EM
	<i>*1A/*1F</i>	6,3	6,0	EM
	<i>*1A/*8</i>	0,5	0,5	IM
	other	-	0,1	
X^2 test P value = 0,69475				

Gene	Genotipo	Frequenza Osservata (%)	Frequenza Attesa (%)	Attività Enzimatica Attesa
<i>CYP3A5</i>	<i>*1A/*1A</i>	1,3	0,9	EM
	<i>*1A/*3A</i>	14,8	15,6	IM
	<i>*1A/*3B</i>	0,8	0,4	IM
	<i>*1A/*3E</i>	0,8	0,8	IM
	<i>*1C/*3A</i>	3,9	3,2	IM
	<i>*3A/*3A</i>	67,7	67,3	PM
	<i>*3A/*3B</i>	3,4	3,8	PM
	<i>*3A/*3E</i>	6,5	6,8	PM
	<i>*3B/*3B</i>	0,3	0,1	PM
	<i>*3E/*3E</i>	0,5	0,2	PM
	other	-	0,9	
X^2 test P value = 0,08255				

Gene	Genotipo	Frequenza Osservata (%)	Frequenza Attesa (%)	Attività Enzimatica Attesa
<i>CYP2C9</i>	<i>*1A/*1A</i>	47,7	47,5	EM
	<i>*1A/*1B</i>	12,4	12,0	EM
	<i>*1A/*1C</i>	1,6	1,4	EM
	<i>*1A/*1D</i>	0,8	1,1	EM
	<i>*1A/*2A</i>	17,4	16,9	IM
	<i>*1A/*2B</i>	3,1	3,8	IM
	<i>*1A/*3A</i>	1,6	1,6	IM
	<i>*1A/*3B</i>	5,7	5,9	IM
	<i>*1B/*1B</i>	0,8	0,8	EM
	<i>*1B/*1D</i>	0,5	0,1	EM
	<i>*1B/*2A</i>	1,6	2,1	IM
	<i>*1B/*2B</i>	0,5	0,5	IM
	<i>*1B/*3A</i>	0,3	0,2	IM
	<i>*1B/*3B</i>	0,5	0,7	IM
	<i>*1C/*2A</i>	0,5	0,3	IM
	<i>*1D/*3B</i>	0,3	0,1	IM
	<i>*2A/*2A</i>	1,6	1,5	PM
	<i>*2A/*2B</i>	0,5	0,7	PM
	<i>*2A/*3A</i>	0,3	0,3	PM
	<i>*2A/*3B</i>	1,0	1,1	PM
	<i>*2B/*2B</i>	0,3	0,1	PM
	<i>*2B/*3A</i>	0,3	0,1	PM
	<i>*2B/*3B</i>	0,4	0,2	PM
	<i>*3B/*3B</i>	0,3	0,2	PM
	other	-	0,8	
X^2 test P value = 0,05812				

Gene	Genotipo	Frequenza Osservata (%)	Frequenza Attesa (%)	Attività Enzimatica Attesa
<i>CYP2C19</i>	<i>*1A/*1A</i>	16,6	14,7	EM
	<i>*1A/*1C</i>	3,6	5,0	EM
	<i>*1A/*2A</i>	24,5	25,8	IM
	<i>*1A/*2B</i>	1,8	3,0	IM
	<i>*1A/*4</i>	0,5	0,6	IM
	<i>*1A/*17</i>	12,8	12,9	EM
	<i>*1C/*1C</i>	0,5	0,4	EM
	<i>*1C/*2A</i>	6,3	4,4	IM
	<i>*1C/*2B</i>	0,8	0,5	IM
	<i>*1C/*17</i>	1,3	2,2	EM
	<i>*2A/*2A</i>	11,2	11,4	PM
	<i>*2A/*2B</i>	2,3	2,6	PM
	<i>*2A/*4</i>	0,8	0,5	PM
	<i>*2A/*17</i>	11,2	11,3	EM
	<i>*2B/*2B</i>	0,3	0,2	PM
	<i>*2B/*17</i>	2,3	1,3	EM
	<i>*4/*17</i>	0,3	0,3	EM
	<i>*17/*17</i>	2,9	2,7	UM
	other	-	0,2	
X^2 test P value = 0,05437				

Tabella 13. Frequenze genotipiche dei citocromi *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9* e *CYP2C19* e relativa attività enzimatica attesa nei 250 individui Sardi studiati. Le frequenze genotipiche sono risultate essere in equilibrio con l'equazione di Hardy-Weinberg (X^2 test P value > 0,05).

4.2 Piattaforma Monogenica

Per quanto riguarda la piattaforma di screening del gene *CYP2D6* sono stati analizzati complessivamente 66 polimorfismi. Di questi, sette, i polimorfismi -1584C>G, -740C>T, 100C>T, 1846G>A, 2850C>T, 2988G>A e 4180G>C, sono stati confermati, su tutti i 250 campioni, con la metodologia della discriminazione allelica, utilizzando le sonde TaqMan® DME (Applied Biosystems™). La concordanza dei risultati, anche in questo caso, è stata del 100 %.

La piattaforma di screening disegnata in questo studio è in grado di rilevare la presenza degli alleli più frequenti fino ad oggi descritti nella popolazione Caucasica. In particolare, tra gli alleli che riducono o annullano completamente l'attività enzimatica, sono stati inclusi gli alleli più comuni, quali ad esempio gli alleli *CYP2D6**3, *4, *10 e *41, ed inoltre alcuni alleli più rari, associati sempre a fenotipo PM, come gli alleli *CYP2D6**6, *9, *15, *20 e *28. Oltre a questi, attraverso la piattaforma, è stato possibile valutare la presenza di altri alleli che non alterano l'attività enzimatica, ma che sono largamente rappresentati nei Caucasici. Si tratta degli alleli *CYP2D6**2 e *35.

Inoltre, data la possibilità di ricombinazione del gran numero di SNPs analizzati con questa piattaforma, è stata anche possibile la caratterizzazione di alleli non caratteristici della popolazione Caucasica, quali i sotto-alleli *CYP2D6**2N, *2M e *4N, e gli alleli *CYP2D6**64 e *65, caratteristici della popolazione Afroamericana, e, ancora, i sotto-alleli *CYP2D6**3A, *4B e *4L, e gli alleli *CYP2D6**14, *36 e *39, caratteristici invece della popolazione Asiatica (88).

Infine, lo studio della presenza di grossi riarrangiamenti strutturali, quali le delezioni o le duplicazioni dell'intero gene, è stato eseguito utilizzando la metodologia TaqMan® Gene CNV (Applied Biosystems™). In questo modo è stato possibile verificare la presenza degli alleli *CYP2D6**5 (delezione), *1xN e *2xN (duplicazioni).

La totalità delle frequenze osservate nei campioni Sardi (Tabella 14) non sono totalmente in linea rispetto a quelle precedentemente descritte nella popolazione Caucasica (89-91) e risultano discostarsi anche dall'unico studio precedente effettuato su campioni Sardi (92), ma in quest'ultimo caso, è probabilmente dovuto al numero limitato di campioni di DNA analizzati (solo 48) ed al basso numero di polimorfismi (nove) ed alleli (otto) studiati nella precedente analisi.

L'allele wild type *CYP2D6*1*, associato ad un fenotipo EM, è stato osservato con una frequenza del 31,4%, presentando i sotto-alleli di tipo *CYP2D6*1A*, **1B* e **1D*.

L'allele *CYP2D6*2*, associato anch'esso ad un fenotipo EM, è stato osservato con una frequenza del 20,4%, frequenza che non si discosta della media Caucasica, ma è da segnalare la presenza dei soli sotto-alleli *CYP2D6*2A*, **2L* e **2M*, questi ultimi finora osservati solo all'interno della popolazione Afroamericana.

Non sono state osservate differenze significative di frequenza per gli alleli *CYP2D6*3* e **4* (93), associati entrambi ad un fenotipo PM. È da sottolineare però la sola presenza dei sotto-alleli *CYP2D6*3B* (2,2%), questo in accordo col fatto che il sotto-allele *CYP2D6*3A* è caratteristico della popolazione Asiatica, e del *CYP2D6*4A* (16,8%) ma non delle altre sotto-varianti alleliche (*CYP2D6*4D*, **4K* e **4M*) presenti invece nella popolazione Caucasica.

È stata invece riscontrata una maggiore presenza degli alleli *CYP2D6*4I* (17,8 contro 3,6%), e dell'allele *CYP2D6*10* (5,4 contro 2-3%). Entrambi gli alleli sono associati ad un fenotipo PM. Anche per l'allele *CYP2D6*10* è da sottolineare la sola presenza del sotto-allele *CYP2D6*10B*.

È stata inoltre osservata, seppure in percentuali minime (0,2 – 0,2 – 0,6 – 0,2 – 0,8%), la presenza degli alleli più rari *CYP2D6*6*, **9*, **15*, **20* e **28*, tutti associati a fenotipi PM, dato che non si discosta dalla frequenza Caucasica. Anche per l'allele *CYP2D6*6* è da sottolineare la presenza del solo sotto-allele *CYP2D6*6A*.

Infine, l'allele *CYP2D6*35A*, associato ad un fenotipo EM, è stato trovato con una frequenza

dell'1,0%, in questo caso in linea con le frequenze Caucasiche.

La delezione genica, associata al fenotipo PM, allele *CYP2D6**5, è stata osservata con una frequenza dell'1,0%, in linea con le frequenze riportate in letteratura per la popolazione Caucasica.

Invece le duplicazioni geniche, associate al fenotipo UM, sono state osservate sia per l'allele *CYP2D6**1xN che per l'allele *CYP2D6**2xN, ma in percentuale inferiore rispetto a quelle riportate in letteratura per la popolazione Caucasica (rispettivamente 0,8 e 1,2 contro 2,0%) (94).

In linea di massima, è stata riscontrato un considerevole incremento delle frequenze di alleli associati ad un fenotipo di tipo PM, rispetto alle frequenze precedentemente descritte per la popolazione Caucasica, il 20,3% contro il 6-10% (95). Nonostante ciò, le frequenze genotipiche e le frequenze dei fenotipi attesi (Tabella 15) non si discostano molto dalle frequenze attese per la popolazione Caucasica (91).

Anche le frequenze genotipiche per il *CYP2D6* sono risultate essere in equilibrio con l'equazione di Hardy–Weinberg, con un X^2 test P value = 0,05748 (Tabelle 15).

Gene	Allele	Numero di Cromosomi	Frequenza (%)	Attività Enzimatica Associata	Allele	Numero di Cromosomi	Frequenza (%)	Attività Enzimatica Associata
<i>CYP2D6</i>	<i>*1A</i>	148	29,6	EM	<i>*12</i>	-	-	PM
	<i>*1B</i>	5	1,0	EM	<i>*14A</i>	-	-	PM
	<i>*1D</i>	4	0,8	EM	<i>*14B</i>	-	-	PM
	<i>*1E</i>	-	-	EM	<i>*15</i>	3	0,6	PM
	<i>*2A</i>	83	16,6	EM	<i>*17</i>	-	-	PM
	<i>*2B</i>	-	-	EM	<i>*19</i>	-	-	PM
	<i>*2D</i>	-	-	EM	<i>*20</i>	1	0,2	PM
	<i>*2E</i>	-	-	EM	<i>*22</i>	-	-	EM
	<i>*2F</i>	-	-	EM	<i>*23</i>	-	-	EM
	<i>*2G</i>	-	-	EM	<i>*24</i>	-	-	EM
	<i>*2K</i>	-	-	EM	<i>*25</i>	-	-	EM
	<i>*2L</i>	11	2,2	EM	<i>*26</i>	-	-	EM
	<i>*2M</i>	8	1,6	EM	<i>*27</i>	-	-	EM
	<i>*3A</i>	-	-	PM	<i>*28</i>	4	0,8	PM
	<i>*3B</i>	11	2,2	PM	<i>*29</i>	-	-	PM
	<i>*4A</i>	84	16,8	PM	<i>*30</i>	-	-	EM
	<i>*4B</i>	-	-	PM	<i>*31</i>	-	-	PM
	<i>*4D</i>	-	-	PM	<i>*32</i>	-	-	EM
	<i>*4K</i>	-	-	PM	<i>*33</i>	-	-	EM
	<i>*4L</i>	-	-	PM	<i>*35A</i>	5	1,0	EM
	<i>*4M</i>	-	-	PM	<i>*36</i>	-	-	EM
	<i>*4N</i>	-	-	PM	<i>*37</i>	-	-	EM
	<i>*5</i>	5	1,0	PM	<i>*38</i>	-	-	PM
	<i>*6A</i>	1	0,2	PM	<i>*39</i>	-	-	EM
	<i>*6C</i>	-	-	PM	<i>*41</i>	89	17,8	PM
	<i>*6D</i>	-	-	PM	<i>*43</i>	-	-	EM
	<i>*7</i>	-	-	PM	<i>*58</i>	-	-	EM
	<i>*8</i>	-	-	PM	<i>*59</i>	-	-	PM
	<i>*9</i>	1	0,2	PM	<i>*64</i>	-	-	EM
	<i>*10A</i>	-	-	PM	<i>*65</i>	-	-	EM
	<i>*10B</i>	27	5,4	PM	<i>*1xN</i>	4	0,8	UM
	<i>*11</i>	-	-	PM	<i>*2xN</i>	6	1,2	UM

Tabella 14. Frequenze alleliche del citocromo *CYP2D6* estrapolate dall'analisi genetica effettuata su 250 campioni di DNA estratti da individui sani di origine Sarda ed attività enzimatica associata agli alleli. Numero totale di Cromosomi = 500.

Gene	Genotipo	Frequenza Osservata (%)	Frequenza Attesa (%)	Attività Enzimatica Attesa	Genotipo	Frequenza Osservata (%)	Frequenza Attesa (%)	Attività Enzimatica Attesa
CYP2D6	*1A/*1A	8,4	8,8	EM	*2A/*3B	0,8	0,7	IM
	*1A/*1B	0,8	0,7	EM	*2A/*4A	5,6	5,6	IM
	*1A/*1D	0,4	0,5	EM	*2A/*5	0,4	0,3	IM
	*1A/*1xN	0,7	0,6	UM	*2A/*10B	2,0	1,8	IM
	*1A/*2A	9,6	9,8	EM	*2A/*28	0,4	0,3	IM
	*1A/*2L	1,6	1,5	EM	*2A/*35A	0,4	0,3	EM
	*1A/*2M	1,2	1,1	EM	*2A/*41	6,0	5,9	IM
	*1A/*2xN	0,9	0,8	UM	*2L/*4A	0,8	0,7	IM
	*1A/*3B	1,6	1,5	IM	*2L/*10B	0,4	0,2	IM
	*1A/*4A	9,2	9,9	IM	*2L/*41	0,8	0,8	IM
	*1A/*5	0,8	0,7	IM	*2M/*4A	0,4	0,5	IM
	*1A/*6A	0,4	0,3	IM	*2M/*41	0,8	0,7	IM
	*1A/*9	0,4	0,3	IM	*2xN/*4A	0,4	0,3	EM
	*1A/*10B	3,2	3,2	IM	*2xN/*41	0,4	0,4	EM
	*1A/*15	0,4	0,4	IM	*3B/*4A	0,8	0,7	PM
	*1A/*20	0,4	0,3	IM	*3B/*10B	0,4	0,2	PM
	*1A/*28	0,4	0,5	IM	*3B/*41	0,8	0,8	PM
	*1A/*35A	0,8	0,7	EM	*4A/*4A	2,8	2,9	PM
	*1A/*41	9,6	10,5	IM	*4A/*5	0,4	0,4	PM
	*1B/*2A	0,4	0,3	EM	*4A/*10B	2,0	1,9	PM
	*1B/*4A	0,4	0,3	IM	*4A/*15	0,4	0,3	PM
	*1B/*41	0,4	0,4	IM	*4A/*28	0,4	0,4	PM
	*1D/*2A	0,4	0,4	EM	*4A/*35A	0,4	0,3	IM
	*1D/*4A	0,4	0,4	IM	*4A/*41	6,0	6,0	PM
	1D/*41	0,4	0,4	IM	*5/*41	0,4	0,4	PM
	*1xN/*2A	0,4	0,3	UM	*10B/*10B	0,4	0,3	PM
	*1xN/*4A	0,4	0,3	IM	*10B/*41	2,0	1,9	PM
	*1xN/*41	0,4	0,4	IM	*15/*41	0,4	0,3	PM
	*2A/*2A	2,4	2,8	EM	*28/*41	0,4	0,3	PM
	*2A/*2L	0,8	0,7	EM	*35A/*41	0,4	0,4	IM
	*2A/*2M	0,8	0,8	EM	*41/*41	3,2	3,2	PM
	*2A/*2xN	0,4	0,3	UM	other	-	0,9	
X^2 test P value = 0,05748								

Tabella 15. Frequenze genotipiche del citocromo *CYP2D6* e relativa attività enzimatica attesa nei 250 individui Sardi studiati. Le frequenze genotipiche sono risultate essere in equilibrio con l'equazione di Hardy-Weinberg (X^2 test P value > 0,05).

5. CONCLUSIONI

La conoscenza a priori dei genotipi enzimatici potrebbe dare un importante contributo al trattamento delle patologie psichiatriche. La necessità di prevedere in anticipo chi svilupperà reazioni avverse e chi avrà una risposta terapeutica ottimale è cruciale ai fini di una buona pratica clinica per prevenire le frequentissime ospedalizzazioni conseguenti alle reazioni avverse ai farmaci.

L'esigenza di poter usufruire di strumenti diagnostici in grado di individuare la presenza di polimorfismi genici correlabili con il profilo dell'efficacia e/o sicurezza della terapia, diventa sempre più significativa nella pratica clinica, anche se, attualmente, non esiste ancora un vero e proprio mercato di riferimento. Inoltre la ricerca scientifica in questo settore sta sviluppando un notevole interesse verso l'analisi di più geni e/o di specifici aplotipi piuttosto che di singoli polimorfismi, avendo ormai compreso che la ridotta o mancata efficacia o gli effetti avversi di un farmaco sono, molto spesso, da ritenersi come un “ tratto genetico complesso” e quindi non sempre riconducibile ad un unico polimorfismo o target genico.

Lo studio dei polimorfismi di alcuni isoenzimi del CYP450, coinvolti nel metabolismo di fase I della maggior parte dei farmaci utilizzanti nei trattamenti delle patologie psichiatriche, come test di screening prima dell'inizio della terapia con gli antipsicotici, potrebbe essere applicato di routine per indirizzare la scelta del medico verso i farmaci che più si adattano al profilo di rischio del paziente.

In questo studio sono stati analizzati alcuni fra i principali polimorfismi e varianti alleliche Caucasiche di 5 geni appartenenti alla famiglia del CYP450 e precisamente:

- 12 SNPs e 14 varianti del gene *CYP3A4*
- 8 SNPs e 8 varianti del gene *CYP3A5*
- 11 SNPs e 9 varianti del gene *CYP2C9*
- 14 SNPs e 13 varianti del gene *CYP2C19*
- 66 SNPs e 62 varianti del gene *CYP2D6*

I 45 SNPs dei citocromi *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9* e *CYP2C19* sono stati raggruppati in una piattaforma multigenica suddivisa in 3 saggi multipli da 8-, 16- e 21-plex ed analizzati con la piattaforma MALDI-TOF.

I 66 SNPs del citocromo *CYP2D6* sono stati raggruppati in una piattaforma monogenica suddivisa in 5 saggi multipli da 12-, 13-, 13-, 14- e 14-plex, analizzati apportando modificazioni alla piattaforma MALDI-TOF.

Nove fra i 111 SNPs analizzati sono stati sottoposti a convalida con metodiche alternative:

- 7 SNPs del *CYP2D6* ed uno del *CYP2C9* sono stati validati con la metodica dell'Allelic Discrimination (Applied BiosystemsTM). I risultati hanno dato una conferma del 100% per tutti i 250 campioni analizzati.
- Uno SNP del *CYP2C19* è stato validato con analisi PCR-RFLP. Anche in questo caso i risultati hanno dato una conferma del 100% per tutti i 250 campioni analizzati.

La concordanza dei risultati ottenuti con le differenti metodiche utilizzate è indicativo dell'affidabilità dei risultati ottenuti con la piattaforma MALDI-TOF.

Le metodiche MALDI-TOF ed Allelic Discrimination non permettono l'individuazione di varianti di numero di copie geniche. All'interno della piattaforma monogenica, per alcuni campioni eterozigoti che si presentavano come outlier nel cluster di distribuzione (Figura 12), è stata ipotizzata la presenza di duplicazioni. Individui invece completamente omozigoti per tutti gli SNPs analizzati si poteva presupporre la presenza di una delezione genica.

La ricerca di delezioni e duplicazioni geniche nel gene del *CYP2D6* è stata quindi effettuata su tutti i 250 campioni con la metodica del Gene Copy Number Variation (Applied BiosystemsTM). Tutti gli individui eterozigoti presentanti polimorfismi outlier e caratterizzati da uno sbilanciamento nello spettro di massa (Figure 14 e 15) si sono rilevati essere portatori di CNV, quindi associati ad un fenotipo UM. Alcuni individui completamente omozigoti si sono rilevati essere portatori dell'allele *CYP2D6**5, associato ad un fenotipo PM.

I dati genetici relativi alla popolazione Sarda analizzata, raccolti e confrontati con quelli relativi alla popolazione Caucasica, hanno fatto emergere alcune discordanze in termini di variazione di frequenze alleliche

Il risultato di questa analisi ha stabilito che solo le frequenze alleliche per i citocromi *CYP3A4* e *CYP2C9* osservate nei campioni della popolazione Sarda sono in linea con quelle descritte nella popolazione Caucasica, mentre le frequenze alleliche osservate nei citocromi *CYP3A5*, *CYP2C19* e *CYP2D6*, risultano discostarsi dalle frequenze finora descritte, presentando in modo particolare la presenza di alleli predittivi di un fenotipo PM.

Per quanto riguarda il *CYP2D6*, in modo particolare, la ricombinazione dei singoli SNPs ha permesso l'analisi anche di alleli in genere rari o addirittura non presenti nella popolazione Caucasica, quali i sotto-alleli *CYP2D6**2L, *2M, caratteristici della popolazione Afroamericana ed associati ad un fenotipo PM, dimostrando ancora una volta la particolarità genetica dei Sardi rispetto al resto degli

Europei.

È però da riscontrare la presenza, nella maggior parte dei casi analizzati, di genotipi predittivi fenotipi IM, dato che non si discosta da ciò che viene descritto per la popolazione Caucasica ad eccezione del gene *CYP3A5*, dove il 78,4% di individui si presenta con un fenotipo atteso PM.

Questi dati sono da tenere in considerazione in caso di somministrazione di farmaci che vengono metabolizzati da questi enzimi, in modo particolare per il *CYP2C19* e *CYP2D6*, implicati in prima linea nel metabolismo della quasi totalità dei farmaci ad azione centrale.

La realizzazione di questa piattaforma di screening farmacogenetica, applicata al trattamento delle patologie psichiatriche, rappresenta uno strumento particolarmente versatile ed affidabile, applicabile sia negli studi di associazione a carattere multigenico, sia nell'attività clinica, per la definizione della terapia personalizzata, consentendo di evitare la mancata o parziale risposta terapeutica o ancora la comparsa di seri effetti collaterali e può inoltre dare indicazioni utili al fine di evitare fenomeni di inibizione o induzione enzimatica, causati dalla concomitante somministrazione di più farmaci.

Inoltre, per via del numero elevato di farmaci metabolizzati dai 5 isoenzimi oggetto dello studio, non è da escludere l'applicabilità di questa piattaforma anche ad altre patologie che richiedano l'uso di altre tipologie di farmaci, quali, per esempio, FANS, inibitori della pompa protonica, chemoterapici ed anticoagulanti.

Infine, i risultati generati, fra i primi relativi alle frequenze geniche nella popolazione Sarda e potranno essere di riferimento per i futuri studi di farmacogenetica su pazienti appartenenti a questa popolazione, definita come un "isolato genetico" (66,67) e pertanto differente da quella Caucasica.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Zandi PP, Judy JT. The promise and reality of pharmacogenetics in psychiatry. Clin Lab Med. 2010; 30(4):931-974
2. Mihaljević-Peles A, Sagud M, Bozina N, Zivković M, Jovanović N. Pharmacogenetics and antipsychotics in the light of personalized pharmacotherapy. Psychiatr Danub. 2010; 22(2):335-337
3. Plesnicar BK. Personalized antipsychotic treatment: the adverse effects perspectives. Psychiatr Danub. 2010; 22(2):329-334
4. Rochon PA, Stukel TA, Sykora K, Gill S, Garfinkel S, Anderson GM, Normand SL, Mamdani M, Lee PE, Li P, Bronskill SE, Marras C, Gurwitz JH. Atypical antipsychotics and parkinsonism. Arch Intern Med. 2005; 125(16):1882-1888
5. Kalow W. Pharmacogenetics and personalised medicine. Fundam Clin Pharmacol. 2002; 16(5):337-342
6. Saba L, Pani L. Farmacogenetica degli antipsicotici. Lo spettro dell'umore - Psicopatologia e clinica. Trattato italiano di psichiatria, terza edizione. 61-72
7. Garfinkel D. Studies on pig liver microsomes. Enzymic and pigment composition of different microsomal fraction. Arch Biochem Biophys. 1958; 77:493-509
8. Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee. <http://www.cypalleles.ki.se>
9. Danielson P. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. Curr Drug Metab. 2002; 3(6):561-597
10. Graham SE, Peterson JA. How similar are P450s and what can their differences teach us? Archives of Biochemistry and Biophysics. 1999; 369:24-29
11. Philpot RM. Characterization of cytochrome P450 in extrahepatic tissues. Meth Enzymology. 1991; 206:623-631

12. Meunier B, de Visser SP, Shaik S. Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *Chemical Reviews*. 2004; 104(9):3947-3980
13. Poulos TL, Finzel BC, Howard AJ. High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. *Journal of Molecular Biology*. 1987; 195(3):687-700
14. Ortiz de Montellano PR. Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry, 2nd ed., New York, Plenum 1995
15. Lewis D. 57 varieties: the human cytochromes. *Pharmacogenomics*. 2004; 5:305-318.
16. Nelson D. Cytochromes P450 in humans. *Methods Mol Biol*. 2003
17. Parkinson A. An overview of current cytochrome P450 technology for assessing the safety and efficacy of new materials. *Toxicol Phatol*. 1996; 24:45-57.
18. Oscarson M, Ingelman-Sundberg M. CYPalleles: a web page for nomenclature of human Cytochrome P450 alleles. *Drug Metab. Pharmacokin*. 2002; 17(6):491-495
19. Meyer UA. Pharmacogenetics-the slow, the rapid and the ultrarapid. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1983-1984.
20. Schaeffeler E, Schwab M, Eichelbaum M, Zanger UM. *CYP2D6* genotyping strategy based on gene copy number determination by TaqMan Real-Time PCR. *Human Mutation*. 2003; 22:476-485
21. Spina E, de Leon J. Metabolic drug interactions with newer antipsychotics: a comparative review. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2007; 100(1):4-22
22. Lin JH, Lu AYH. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Arch Clin Pharmacokinet*. 1998; 35:361-390
23. Gonzalez FJ. Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends Pharmacol Sci*. 1992; 13:346-352.

24. Inoue K, Inazawa J, Nakagawa H, Shimada T, Yamazaki H, Guengerich FP, Abe T. Assignment of the human cytochrome P-450 nifedipine oxidase gene (*CYP3A4*) to chromosome 7 at band q22.1 by fluorescence in situ hybridization. *Jpn J Hum Genet.* 1992; 37(2):133-138
25. Entrez Gene: CYP3A4 cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=1576>
26. Hashimoto H, Toide K, Kitamura R, Fujita M, Tagawa S, Itoh S, Kamataki T. Gene structure of *CYP3A4*, an adult-specific form of cytochrome P450 in human livers, and its transcriptional control. *Eur J Biochem.* 1993; 218 (2):585–595
27. Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology.* 1999; 39:1-17
28. Robertson G, Field J, Goodwin B, Bierach S, Tran M, Lehnert A, Liddle C. Transgenic mouse models of human CYP3A4 gene regulation. *Mol Pharmacol.* 2003; 64(1):42–50
29. “Facts for prescribers”, Swedish environmental classification of pharmaceuticals (Fakta för förskrivare)
30. Flockhart DA. Drug Interactions: Cytochrome P450 Drug Interaction Table. Indiana University School of Medicine. 2008
31. Flower R, Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Rang & Dale’s pharmacology. Edinburgh: Churchill Livingstone. 2007
32. Bondy B, Spellmann I. Pharmacogenetics of antipsychotics: useful for the clinician? *Curr Opin Psychiatry.* 2007; 20(2):126-130
33. Park JY, Kim KA, Kim SL. Chloramphenicol is a potent inhibitor of cytochrome P450 isoforms CYP2C19 and CYP3A4 in human liver microsomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(11):3464–3469

34. Matsumoto S, Yamazoe Y. Involvement of multiple human cytochromes P450 in the liver microsomal metabolism of astemizole and a comparison with terfenadine. *British journal of clinical pharmacology*. 2001; 51(2):133–142.
35. Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv.Rev*. 2002; 54:1271–1294
36. Entrez Gene: CYP3A5 cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=1577>
37. Romkes M, Faletto MB, Blaisdell JA, Raucy JL, Goldstein JA. Cloning and expression of complementary DNAs for multiple members of the human cytochrome P450IIC subfamily. *Biochemistry*.1991; 30(13):3247–3255
38. Inoue K, Inazawa J, Suzuki Y, Shimada T, Yamazaki H, Guengerich FP, Abe T. Fluorescence in situ hybridization analysis of chromosomal localization of three human cytochrome P450 2C genes (*CYP2C8*, *2C9*, and *2C10*) at 10q24.1. *Jpn J Hum Genet*. 1994; 39(3):337–343
39. Rettie AE, Jones JP. Clinical and toxicological relevance of CYP2C9: drug-drug interactions and pharmacogenetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005; 45:477–494
40. Entrez Gene: CYP2C9 cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=1559>
41. Sim SC. CYP2C9 allele nomenclature. Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. Karolinska Institutet. 2008
42. García-Martín E, Martínez C, Ladero JM, Agúndez JA. Interethnic and intraethnic variability of *CYP2C8* and *CYP2C9* polymorphisms in healthy individuals. *Mol Diagn Ther*. 2006; 10(1):29–40
43. Rosemary J, Adithan C. The pharmacogenetics of *CYP2C9* and *CYP2C19*: ethnic variation and clinical significance. *Curr Clin Pharmacol*. 2007; 2(1):93–109

44. Guo Y, Zhang Y, Wang Y, Chen X, Si D, Zhong D, Fawcett JP, Zhou H. Role of *CYP2C9* and its variants (*CYP2C9*3* and *CYP2C9*13*) in the metabolism of lornoxicam in humans. *Drug Metab Dispos.* 2005; 33(6):749–753
45. Kimura Y, Ito H, Ohnishi R, Hatano T. Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48(1):429–435
46. Pan X, Tan N, Zeng G, Zhang Y, Jia R. Amentoflavone and its derivatives as novel natural inhibitors of human Cathepsin B. *Bioorg Med Chem.* 2005; 13(20):5819–5825
47. Gray IC, Nobile C, Muresu R, Ford S, Spurr NK. A 2.4-megabase physical map spanning the *CYP2C* gene cluster on chromosome 10q24. *Genomics.* 1995; 28(2):328–332
48. Entrez Gene: CYP2C19 cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=1557>
49. Bertilsson L. Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P450 (CYP) 2D6 and 2C19. *Clin Pharmacokinet.* 1995; 29(3):192–209
50. Desta Z, Zhao X, Shin JG, Flockhart DA. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet.* 2002; 41(12):913–958
51. Entrez Gene: CYP2D6 cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=1565>
52. Fuselli S, Dupanloup I, Frigato E, Cruciani F, Scozzari R, Moral P, Sistonen J, Sajantila A, Barbujani G. Molecular diversity at the CYP2D6 locus in the Mediterranean region. *European Journal of human Genetics.* 2004; 12:916-924
53. Shaker A, Ross Hawkins J. DNA variation and the future of human genetics. *Nat Biotechnol.* 1998; 16(1):33-39
54. Landegren U, Nilsson M, Kwok PY. Reading Bits of Genetic Information: Methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genom Res.* 1998; 8:769-776.

55. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999; 8, 234(2):177-186
56. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ, Lipshutz R, Chee M, Lander ES. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*. 1998; 15, 280:1077-1082
57. Bhasi K, Zhang L, Brazeau D, Zhang A, Ramanathan M. Information-theoretic identification of predictive SNPs and supervised visualization of genome –wide association studies. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34(14):e101
58. Alarcón-Riquelme M.E. The genetic of systemic lupus erythematosus: understanding how SNPs confer disease susceptibility. *Springer Semin Immunopathol*. 2006; 28(2):109-117
59. International HapMap Project. <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>
60. Koo SH, Lee EJD. Pharmacogenetics approach to therapeutics. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2006; 33:525-532
61. Stanssens P, Zabeau M, Meersseman G, Remes G, Gansemans Y, Storm N, Hartmer R, Honisch C, Rodi CP, Böcker S, van den Boom D. High-Throughput MALDI-TOF Discovery of Genomic Sequence Polymorphisms. *Genome Res*. 2004; 14:126-133
62. Gut IG. Automation in Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms. *Hum Mutat*. 2001; 17(6):475-492
63. Ragoussis J. Genotyping technologies for all. *Drug Discov Today Technologies*. 2006; 3(2),115–122
64. Ragoussis J, Elvidge GP, Kaur K, Colella S. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation, Time-of-Flight Mass Spectrometry in Genomics Research. *PLoS Genet*. 2006; 2(7):e100
65. GENETICA MEDICA. Gelehrter TD, Collins FS, Ginsburg D, ed. Masson

66. Lampis R, Morelli L, De Virgiliis S, Congia M, Cucca F. The distribution of HLA class II haplotypes reveals that the Sardinian population is genetically differentiated from the other Caucasian populations. *Tissue Antigens*. 2000; 56(6):515-21
67. Eaves IA, Merriman TR, Barber RA, Nutland S, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Cucca F, Todd JA. The genetically isolated populations of Finland and Sardinia may not be a panacea for linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat Genet*. 2000; 25(3):320-3
68. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Plainview, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1982
69. NCBI Single Nucleotide Polymorphism dbSNP. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>
70. Ensembl Genome Browser. <http://www.ensembl.org/index.html>
71. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
72. iPLEX™ Gold Application Guide Version 1, Revision 0. November 10, 2006. <http://www.sequenom.com>
73. van den Boom D, Ehrich M. Discovery and identification of sequence polymorphisms and mutations with MALDI-TOF MS. *Methods Mol Biol* 2007; 366:287-306
74. Kirchheiner J, Seeringer A: Clinical implications of pharmacogenetics of cytochrome P450 drug metabolizing enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1770(3):489-494
75. Homo sapiens cytochrome P4502D6 (CYP2D6) gene, *CYP2D6*1* allele, complete cds. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/45024927>
76. Goldstein JA: Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol*. 2001; 52(4):349-355
77. Tost J, Gut IG: Genotyping single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry in clinical applications. *Clin Biochem*. 2005; 38:335–350

78. McGuigan FE, Ralston SH: Single nucleotide polymorphism detection: allelic discrimination using TaqMan. *Psychiatr Genet*. 2002; 12(3):133-136
79. Sim SC, Risinger C, Dahl ML et al.: A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clin Pharmacol Ther*. 2006; 79(1):103-113
80. TaqMan® Copy Number Assays Protocol, 2009. <http://www.appliedbiosystems.com>
81. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*. 2001; 68(4):978-89
82. Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol*. 1995; 12:921–927
83. Mizutani T. PM frequencies of major CYPs in Asians and Caucasians. *Drug Metab Rev*. 2003; 35(2-3):99-106
84. Solus JF, Arietta BJ, Harris JR, Sexton DP, Steward JQ, McMunn C, Ihrie P, Mehall JM, Edwards TL, Dawson EP. Genetic variation in eleven phase I drug metabolism genes in an ethnically diverse population. *Pharmacogenomics*. 2004; 5(7):895-931
85. Xie HG, Wood AJ, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR. Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics*. 2004; 5(3):243-272
86. Roy JN, Lajoie J, Zijenah LS, Barama A, Poirier C, Ward BJ, Roger M. CYP3A5 genetic polymorphisms in different ethnic populations. *Drug Metab Dispos*. 2005; 33(7):884-887
87. Xie HG, Kim RB, Wood AJ, Stein CM. Molecular basis of ethnic differences in drug disposition and response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001; 41:815-850
88. Suarez-Kurtz G. Pharmacogenomics in admixed populations. *Trends Pharmacol Sci*. 2005; 26(4):196-201

89. Bradford LD. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics*. 2002; 3(2):229-243
90. Raimundo S, Toscano C, Klein K, Fischer J, Griesse EU, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. A novel intronic mutation, 2988G>A, with high predictivity for impaired function of cytochrome P450 2D6 in white subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 2004; 76(2):128-138
91. Sistonen J, Sajantila A, Lao O, Corander J, Barbujani G, Fuselli S. CYP2D6 worldwide genetic variation shows high frequency of altered activity variants and no continental structure. *Pharmacogenet Genomics*. 2007; 17(2):93-101
92. Fuselli S, Dupanloup I, Frigato E, Cruciani F, Scozzari R, Moral P, Sistonen J, Sajantila A, Barbujani G. Molecular diversity at the CYP2D6 locus in the Mediterranean region. *Eur J Hum Genet*. 2004; 12(11):916-924
93. Droll K, Bruce-Mensah K, Otton SV, Gaedigk A, Sellers EM, Tyndale RF. Comparison of three CYP2D6 probe substrates and genotype in Ghanaians, Chinese and Caucasians. *Pharmacogenetics*. 1998; 8(4):325–333
94. McLellan RA, Oscarson M, Seidegård J, Evans DA, Ingelman-Sundberg M. Frequent occurrence of CYP2D6 gene duplication in Saudi Arabians. *Pharmacogenetics*. 1997; 7(3):187–191
95. Australian Medicines Handbook (AMH) 2004

